

茶树品种‘安吉白茶’*CsDREB-A4b* 基因的克隆及其对非生物胁迫的响应

李 彤, 严雅君, 韩洪润, 刘志薇, 吴致君, 庄 静^①

(南京农业大学园艺学院 茶叶科学研究所, 江苏 南京 210095)

摘要: 采用 RT-PCR 方法从茶树 [*Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze.] 品种‘安吉白茶’(‘Anjibaicha’) 叶片的 cDNA 中克隆得到 1 个编码 DREB 转录因子的基因, 命名为 *CsDREB-A4b*。序列分析结果显示, *CsDREB-A4b* 基因包含长度为 873 bp 的开放阅读框, 编码 290 个氨基酸, 具有保守的 AP2 结构域。与拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] AP2/ERF 家族转录因子进行同源进化分析, *CsDREB-A4b* 转录因子属于 DREB 亚族中的 A4 组。多重比对结果显示, *CsDREB-A4b* 转录因子与蓖麻 (*Ricinus communis* Linn.) 等植物的 DREB 类转录因子保守结构域氨基酸序列的相似性较高。*CsDREB-A4b* 转录因子为亲水性蛋白, 理论相对分子质量为 31 938.5, 理论等电点为 pI 5.91, 总平均疏水性为 -0.603, 碱性、酸性、芳香族和脂肪族氨基酸的比例分别为 12%、12%、7% 和 15%。在高温 (38 °C) 胁迫处理前期, *CsDREB-A4b* 基因的相对表达量显著高于胁迫处理前; 在低温 (4 °C) 胁迫处理下, *CsDREB-A4b* 基因的相对表达量呈显著升高的趋势; 在盐 (200 mmol · L⁻¹ NaCl) 和干旱 (200 g · L⁻¹ PEG) 胁迫处理下, *CsDREB-A4b* 基因的相对表达量呈先降低后显著升高的趋势。表明 *CsDREB-A4b* 基因参与‘安吉白茶’非生物胁迫的响应过程, 且在不同胁迫条件下具有表达差异性。

关键词: 茶树; ‘安吉白茶’; DREB 转录因子; *CsDREB-A4b* 基因; 非生物胁迫; 表达分析

中图分类号: Q786; S571.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-7895(2016)02-0001-09

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2016.02.01

Cloning of *CsDREB-A4b* gene from cultivar ‘Anjibaicha’ of *Camellia sinensis* and its response to abiotic stress LI Tong, YAN Yajun, HAN Hongrun, LIU Zhiwei, WU Zhijun, ZHUANG Jing^① (Tea Research Institute, College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2016, 25(2): 1-9

Abstract: A gene encoding DREB transcription factor was cloned from cDNA in leaf of cultivar ‘Anjibaicha’ of *Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze. by RT-PCR method, which was named as *CsDREB-A4b*. The result of sequence analysis shows that *CsDREB-A4b* gene contains an open reading frame with length of 873 bp, 290 amino acids are encoded, which has a conserved AP2 domain. By homologous evolutionary analysis with AP2/ERF family transcription factors from *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh., *CsDREB-A4b* transcription factor belongs to A4 group in DREB subfamily. The result of multiple alignment shows that amino acid sequence of conserved domain in *CsDREB-A4b* transcription factor has high similarity to that in DREB transcription factors from other plants, such as *Ricinus communis* Linn., etc. *CsDREB-A4b* transcription factor is hydrophilic protein, theoretical relative molecular mass is 31 938.5, theoretical isoelectric point is pI 5.91, grand average of hydrophobicity is -0.603, and in which, percentages of basic, acidic, aromatic and aliphatic amino acids are 12%, 12%, 7% and 15%, respectively. In the early stage of high temperature (38 °C) stress treatment, relative expression of *CsDREB-A4b* gene is significantly higher than that before stress treatment. Under low temperature (4 °C) stress treatment, that of *CsDREB-A4b* gene appears a significantly increasing

收稿日期: 2015-05-13

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划项目(201410307030); 国家自然科学基金资助项目(31200520; 31570691)

作者简介: 李 彤(1993—), 女, 贵州贵阳人, 本科, 主要从事茶树分子生物学方面的研究。

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

trend. Under salt ($200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$) and drought ($200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ PEG}$) stress treatments, that of *CsDREB-A4b* gene appears the trend of firstly decreasing and then significantly increasing. It is indicated that *CsDREB-A4b* gene participates in response process of 'Anjibaicha' to abiotic stress and shows differences in expression under conditions of different stress treatments.

Key words: *Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze.; 'Anjibaicha'; DREB transcription factor; *CsDREB-A4b* gene; abiotic stress; expression analysis

一般情况下,当植物在生长过程中受到逆境胁迫时,其体内一些相关基因对逆境进行响应,使植物对逆境做出适应性反应。基因表达通常受转录水平的调控,转录因子在此调控过程中具有重要作用^[1-2]。AP2/ERF 是一类广泛存在于植物中的重要转录因子,其 AP2 保守结构域包含 60 ~ 70 个氨基酸残基^[3-4];依据 AP2 结构域的差异,可分为 4 个亚族(ERF、DREB、AP2 和 RAV)和 1 个单独成员(Soloist)^[5],其中,DREB 亚族主要参与植物应对干旱、高盐、高温和低温等非生物胁迫调控过程,并起重要作用^[6-9]。目前,DREB 类基因在玉米(*Zea mays* Linn.)^[10]、烟草(*Nicotiana tabacum* Linn.)^[11]、大豆 [*Glycine max* (Linn.) Merr.]^[12] 和小麦(*Triticum aestivum* Linn.)^[13] 等植物中已有报道,在茶树中该类基因的响应机制尚不清楚^[14-16]。

'安吉白茶'('Anjibaicha')是中国珍稀的茶树 [*Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze.] 品种之一,属于低温敏感型,在芽萌发初期,当温度在 23 °C 左右时,新梢进入白化期^[17-18]。极端的温度和水分等非生物胁迫严重影响'安吉白茶'茶叶的产量和品质。近年来,随着全球气候的变化以及随之引发的自然环境异常,茶树经常遭受高温、低温、高盐及干旱胁迫的危害,因此必须培育茶树抗逆新品种。随着分子生物学的快速发展,利用分子技术辅助育种,增强茶树对非生物胁迫的抗逆性具有重要意义。

作者所在课题组已有茶树品种'汝城毛叶茶'('Ruchengmaoyecha')、'云南十里香'('Yunnanshilixiang')、'安吉白茶'和'槎湾三号'('Chawansanhao')的转录组数据,并从中获取了 1 个编码 DREB 转录因子的基因 *CsDREB-A4b*。为验证 *CsDREB-A4b* 基因在茶树对非生物胁迫响应中的作用,作者采用 RT-PCR 方法从'安吉白茶'中克隆获得 *CsDREB-A4b* 基因,对该基因进行序列对比、蛋白理化性质分析及系统进化等生物信息分析;并采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 方法,检测了'安吉白

茶'中 *CsDREB-A4b* 基因在高温、低温、盐和干旱胁迫条件下的表达情况,以期为明确茶树对非生物胁迫的抗逆调控机制及茶树抗性品种选育提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料及处理

供试材料为自然环境下种植的'安吉白茶'2年生扦插幼苗。摘取无病害植株的幼嫩叶片,提取总 RNA。分别对'安吉白茶'健康植株进行低温(4 °C)、高温(38 °C)、盐($200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$)和干旱($200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ PEG}$)胁迫处理,处理时间为 4、8 和 12 h,以自然环境下种植的植株为对照。分别在各时间段采集不同处理的叶片,提取 RNA。

大肠杆菌菌株 DH5 α 为南京农业大学园艺学院茶叶科学研究所保存;质粒载体 pMD18-T、*Ex Taq* DNA 聚合酶、SYBR Premix *Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒和 Prime Script RT reagent Kit 试剂盒等购自宝生物工程(大连)有限公司;DNA 回收试剂盒购自杭州维特洁生化技术公司。各类引物合成和 DNA 测序交由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成 参照 Quick RNA isolation Kit 试剂盒(北京华越洋生物科技有限公司)说明书进行叶片总 RNA 提取,分别使用 One DropTM OD-1000+超微量分光光度计(芮科科技有限公司)和质量浓度 $12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的浓度和质量。按照 Prime Script RT reagent Kit 试剂盒说明书将总 RNA 反转录成 cDNA。

1.2.2 *CsDREB-A4b* 基因的克隆 基于本课题组测序完成的茶树转录组数据,使用 AP2 保守域序列进行检索,获得 *CsDREB-A4b* 基因。根据 *CsDREB-A4b* 基因序列转录组数据,设计 1 对引物,正向引物 ZJR80 序列为 5'-ATGAAGTCTCTTTCTCTCTCC-3',反向引物 ZJR82 序列为 5'-TCAAGCATCCCATGTCAAACCTC-

3'。以‘安吉白茶’叶片 cDNA 第 1 链为模板进行目的片段的扩增。PCR 扩增体系包含 2.5 mmol · L⁻¹ dNTPs Mixture 1.6 μL、25 mmol · L⁻¹ MgCl₂ 1.2 μL、10×*Ex Taq* Buffer 2 μL、5 U · μL⁻¹ *Ex Taq* DNA 聚合酶 0.3 μL、cDNA 1 μL, 正向引物和反向引物各 1 μL, 重蒸水 11.9 μL。PCR 反应扩增程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s、52 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 最后于 72 °C 延伸 10 min。参照 DNA 回收试剂盒说明书将经质量浓度 12 g · L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳分离的 PCR 产物回收, 然后与 pMD18-T 载体连接, 转化至大肠杆菌 DH5α 中。转化后的菌液经鉴定后测序。

1.2.3 序列分析 序列的保守域预测在 NCBI 网站进行, 并采用 BLAST 进行序列同源性比较; 使用 DNAMAN 6.0 软件进行序列多重比对以及亲水性和疏水性预测; 使用 MEGA 5.0 软件构建系统进化树。利用 SMS (<http://www.bio-soft.net/sms>) 和 ExPASy-ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>) 在线网站对氨基酸理化性质、组成成分及理论等电点等进行分析。采用 Subcellular Localization Prediction^[19] 和 NucPred^[20] 软件完成亚细胞定位预测。

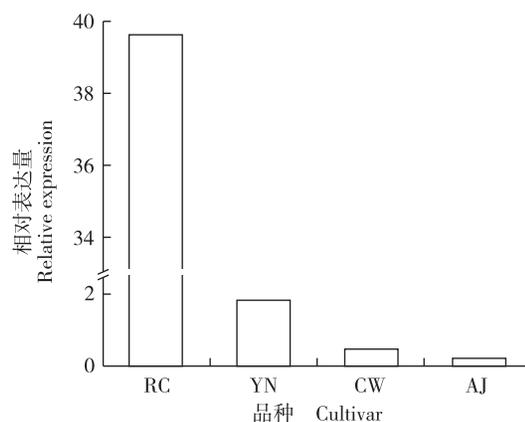
1.2.4 *CsDREB-A4b* 基因的表达分析 为了分析在高温、低温、盐和干旱胁迫下‘安吉白茶’*CsDREB-A4b* 基因的表达谱, 根据 SYBR Premix *Ex Taq* II 试剂盒说明书和 iQTM5 Real-Time PCR System 完成 qRT-PCR。qRT-PCR 扩增程序为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 反应 5 s、60 °C 反应 30 s, 40 个循环; 65 °C 反应 10 s, 61 个循环。每个处理样本设 3 次重复。根据 *CsDREB-A4b* 基因序列设计表达检测引物, 正向引物 ZJR246-T4-28971R 序列为 5'-GCATCACCAACTCATCAACTTCGTC-3'; 反向引物 ZJR247-T4-28971F 序列为 5'-ACTGCCGAGCCAAATGCGTGA-3'。采用相对定量法计算基因的相对表达量, 相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 表示, 其中 $\Delta C_T = C_{T\text{目标基因}} - C_{T\text{actin}}$ ^[21]; 以茶树 *actin* 基因为内参基因, 以未处理茶树叶片为对照。

2 结果和分析

2.1 *CsDREB-A4b* 基因转录组检索

为获取 *CsDREB-A4b* 基因的核苷酸序列及其在自然环境下不同茶树品种中的表达情况, 对茶树品种‘汝城毛叶茶’、‘云南十里香’、‘槎湾三号’和‘安吉

白茶’的转录组数据进行分析, 结果显示: *CsDREB-A4b* 基因在‘安吉白茶’中的相对表达量最低, 在‘云南十里香’和‘槎湾三号’中的相对表达量居中, 在‘汝城毛叶茶’中的相对表达量最高(图 1)。据此推测‘安吉白茶’中 *CsDREB-A4b* 基因的相对表达量较低是其对非生物胁迫抗逆性较差的原因之一, 因此, 本研究对‘安吉白茶’的 *CsDREB-A4b* 基因进行克隆及相关分析。



RC: ‘汝城毛叶茶’ ‘Ruchengmaoyecha’; YN: ‘云南十里香’ ‘Yunnanshilixiang’; CW: ‘槎湾三号’ ‘Chawansanhao’; AJ: ‘安吉白茶’ ‘Anjibaicha’.

图 1 *CsDREB-A4b* 基因在 4 个茶树品种中的表达谱

Fig. 1 Expression profile of *CsDREB-A4b* gene in four cultivars of *Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze.

2.2 *CsDREB-A4b* 基因的克隆

依据引物 ZJR80 和 ZJR82, 以‘安吉白茶’叶片 cDNA 为模板, 扩增得到长度约 900 bp 的特异性片段。对开放阅读框(ORF)的预测及序列分析结果表明, 该 *CsDREB-A4b* 基因包含 1 个长度为 873 bp 的开放阅读框, 编码 290 个氨基酸(图 2)。

2.3 *CsDREB-A4b* 转录因子的进化分析

利用 BLAST-Conserved Domains Search 对茶树品种‘安吉白茶’*CsDREB-A4b* 转录因子的保守结构域进行测试, 结果见图 3。在第 110 位至第 170 位区间含有 1 个保守的 AP2 结构域, 说明该转录因子属于 AP2/ERF 家族。

利用 MEGA 5.0 软件, 构建 *CsDREB-A4b* 转录因子与拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] AP2/ERF 家族转录因子的系统进化树(图 4)。结果显示: ‘安吉白茶’中 *CsDREB-A4b* 转录因子属于 DREB 亚族的 A4 组。

2.4 CsDREB-A4b 转录因子氨基酸序列比对、理化性质分析及亚细胞定位预测

为了进一步分析茶树品种‘安吉白茶’ CsDREB-A4b 转录因子的保守结构域, 将其保守结构域的氨基酸序列与其他植物 DREB 类转录因子保守结构域的氨基酸序列进行多重比对(图 5)。结果显示: ‘安吉白茶’ CsDREB-A4b 转录因子与 *Solanum lycopersicum* Linn. (XP_004241746.1)、蓖麻 (*Ricinus communis* Linn., XP_002515992.1)、*Prunus persica* (Linn.) Batsch (XP_007202464.1)、荷花 (*Nelumbo nucifera* Gaertn., XP_010249578.1)、可可 (*Theobroma cacao* Linn., XP_

007012129.1)、马铃薯 (*Solanum tuberosum* Linn., XP_006359467.1)、毛果杨 (*Populus trichocarpa* Torr. et Gray, XP_002298236.1)、葡萄 (*Vitis vinifera* Linn., XP_002283864.1)、*Nicotiana tomentosiformis* Goodsp. (XP_009596664.1)、甜橙 [*Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck, XP_006465666.1]、芜菁 (*Brassica rapa* Linn., XP_009108829.1)、芝麻 (*Sesamum indicum* Linn., XP_011072408.1) 和林生烟草 (*Nicotiana sylvestris* Speg., XP_009776195.1) 的 DREB 类转录因子保守结构域一致性较高, 并在 N 端存在 YRG 和 WLG 元件。

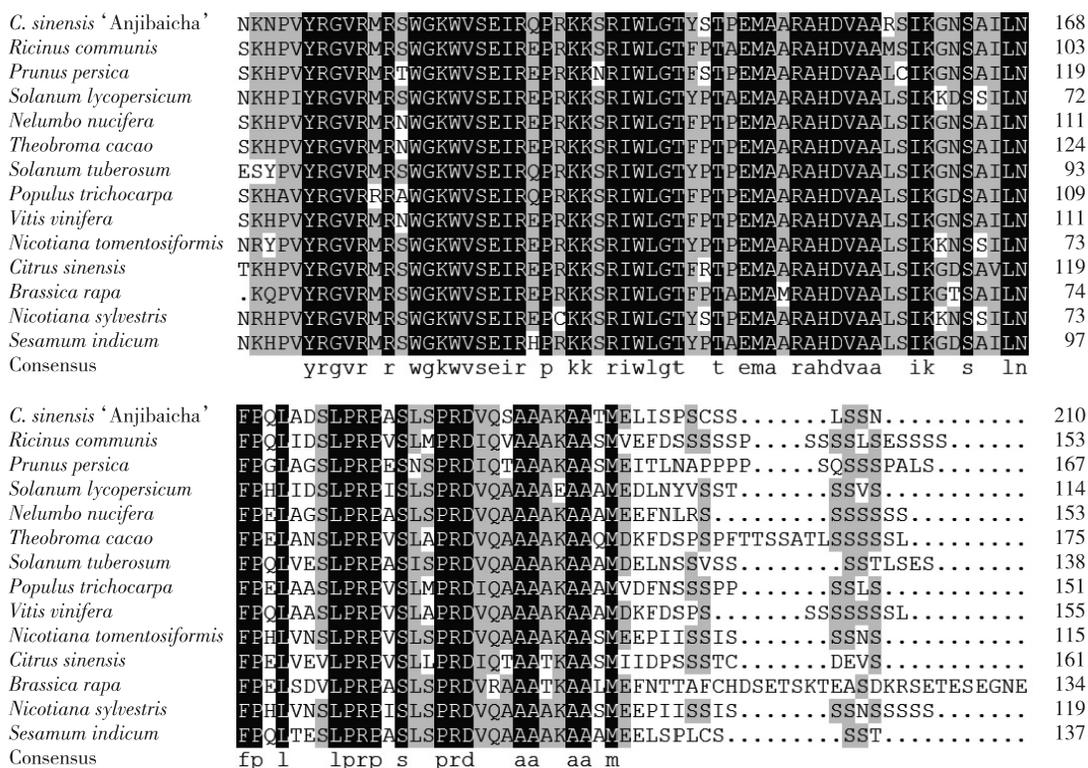


图 5 茶树品种‘安吉白茶’ CsDREB-A4b 转录因子和其他植物 DREB 类转录因子保守结构域氨基酸序列的多重比对结果
 Fig. 5 Result of multiple alignment on amino acid sequences of conserved domains in CsDREB-A4b transcription factor from cultivar ‘Anjibaicha’ of *Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze. and DREB transcription factors from other plants

茶树品种‘安吉白茶’ CsDREB-A4b 转录因子和上述植物 DREB 类转录因子的氨基酸组成及理化性质见表 1。由表 1 可以看出: 茶树品种‘安吉白茶’ CsDREB-A4b 转录因子和上述植物 DREB 类转录因子氨基酸数量为 192 ~ 290, 理论相对分子质量为 21 472.1 ~ 31 938.5, 理论等电点约为 pI 5, 碱性氨基酸比例略低于酸性氨基酸比例, 平均芳香族氨基酸比例为 7.5%, 平均脂肪族氨基酸比例为 16.7%, 总平

均疏水性为 -0.346 ~ -0.657。

利用 DNAMAN 6.0 软件对‘安吉白茶’ CsDREB-A4b 转录因子氨基酸序列进行亲水性和疏水性分析(图 6)。结果显示: CsDREB-A4b 转录因子中的氨基酸大部分属于亲水性氨基酸。其中位于第 95 位的赖氨酸(Lys)的疏水性最弱, 位于第 19 位的苏氨酸(Thr)的亲水性最弱。亚细胞定位预测结果显示: ‘安吉白茶’ CsDREB-A4b 转录因子被定位在细胞核中。

表 1 茶树品种‘安吉白茶’CsDREB-A4b 转录因子与其他植物 DREB 类转录因子氨基酸序列的理化性质分析

Table 1 Analyses on physical and chemical properties of amino acid sequences of CsDREB-A4b transcription factor from cultivar ‘Anjibaicha’ of *Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze. and DREB transcription factors from other plants

种类 ¹⁾ Species ¹⁾	登录号 No. of accession	氨基酸数量 Number of amino acids	理论相对分子质量 Theoretical relative molecular mass	理论等电点 Theoretical isoelectric point	比例/% ²⁾ Percentage ²⁾				总平均疏水性 Grand average of hydrophobicity
					BA	AC	AR	AL	
1		290	31 938.5	5.91	12	12	7	15	-0.603
2	XP_002515992.1	241	25 855.6	4.92	10	13	6	18	-0.346
3	XP_007202464.1	262	28 536.4	4.94	10	12	8	13	-0.657
4	XP_004241746.1	192	21 472.1	4.99	14	16	8	19	-0.463
5	XP_010249578.1	237	26 110.0	4.93	11	14	8	16	-0.561
6	XP_007012129.1	261	28 444.5	4.98	10	12	8	17	-0.515
7	XP_002283864.1	241	26 129.9	4.99	11	13	7	16	-0.544
8	XP_006359467.1	218	24 482.6	5.06	13	16	8	16	-0.570
9	XP_002298236.1	233	25 474.4	5.37	12	13	7	18	-0.426
10	XP_009596664.1	196	22 054.7	5.54	13	14	9	18	-0.536
11	XP_006465666.1	243	26 830.5	4.71	12	16	6	18	-0.598
12	XP_009108829.1	232	25 856.6	4.75	12	16	9	16	-0.548
13	XP_009776195.1	199	22 114.8	5.98	14	13	7	20	-0.459
14	XP_011072408.1	215	23 354.1	5.86	13	13	7	14	-0.487

¹⁾ 1: 茶树品种‘安吉白茶’ Cultivar ‘Anjibaicha’ of *C. sinensis*; 2: 蓖麻 *Ricinus communis* Linn.; 3: *Prunus persica* (Linn.) Batsch; 4: *Solanum lycopersicum* Linn.; 5: 荷花 *Nelumbo nucifera* Gaertn.; 6: 可可 *Theobroma cacao* Linn.; 7: 葡萄 *Vitis vinifera* Linn.; 8: 马铃薯 *Solanum tuberosum* Linn.; 9: 毛果杨 *Populus trichocarpa* Torr. et Gray; 10: *Nicotiana tomentosiformis* Goodsp.; 11: 甜橙 *Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck; 12: 芜菁 *Brassica rapa* Linn.; 13: 林生烟草 *Nicotiana sylvestris* Speg.; 14: 芝麻 *Sesamum indicum* Linn.

²⁾ BA: 碱性氨基酸 Basic amino acids; AC: 酸性氨基酸 Acidic amino acids; AR: 芳香族氨基酸 Aromatic amino acids; AL: 脂肪族氨基酸 Aliphatic amino acids.

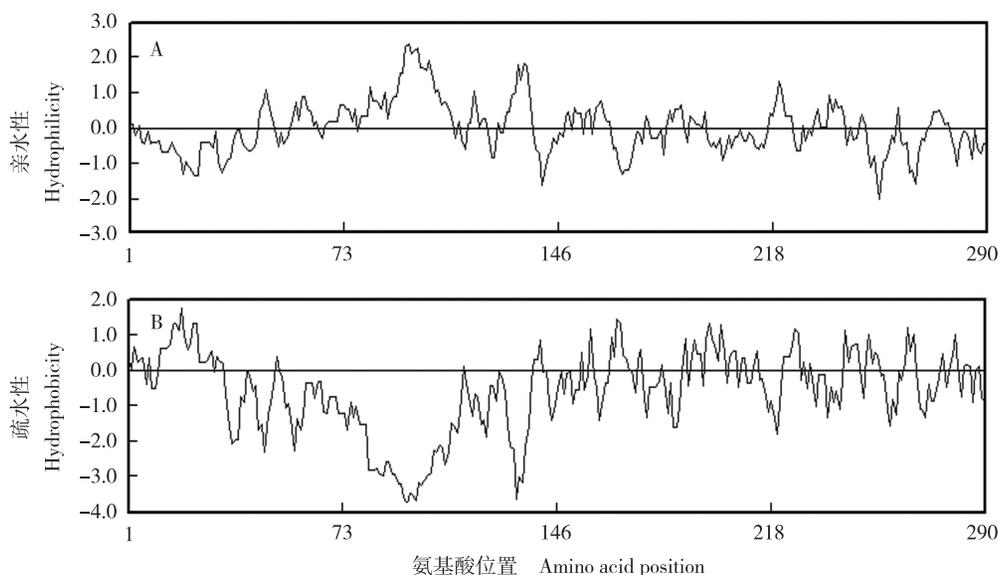


图 6 茶树品种‘安吉白茶’CsDREB-A4b 转录因子氨基酸序列的亲水性 (A) 和疏水性 (B) 分析

Fig. 6 Analyses on hydrophilicity (A) and hydrophobicity (B) of amino acid sequence of CsDREB-A4b transcription factor from cultivar ‘Anjibaicha’ of *Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze.

2.5 CsDREB-A4b 转录因子的二级结构和三级结构分析

对茶树品种‘安吉白茶’CsDREB-A4b 转录因子的二级结构进行预测分析,结果见图 7。结果显示:CsDREB-A4b 转录因子的二级结构由 α -螺旋、 β -折

叠、 β -转角和无规则卷曲构成,所占比例分别为 27.24%、13.45%、4.14% 和 55.17%。

与 CsDREB-A4b 转录因子的三级结构最为相似的转录因子是拟南芥 AP2/ERF 家族中的 AtERF1 转录因子^[22],其 N 端有 1 个 α -螺旋,C 端有 3 个 β -折

叠。*CsDREB-A4b* 转录因子与 *AtERF1* 转录因子的差异位点有 15 个, 其中位于 α -螺旋区域的位点有 7 个, 位于 β -折叠区域的位点有 8 个, 但是这些差异位点对

CsDREB-A4b 转录因子的三级结构并没有显著影响 (图 8)。

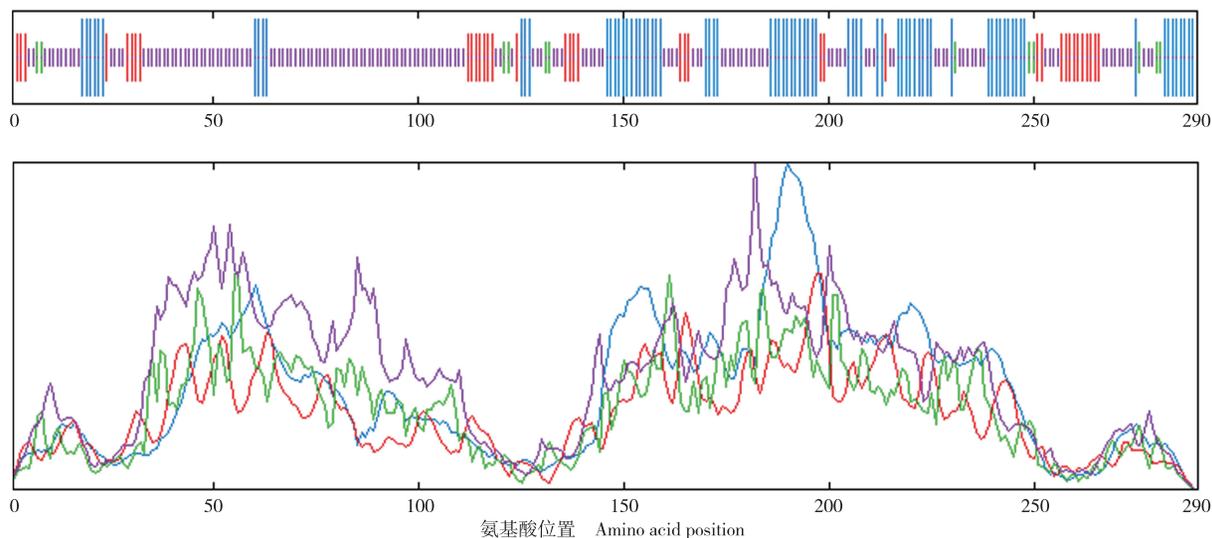


图 7 茶树品种‘安吉白茶’ *CsDREB-A4b* 转录因子的二级结构

Fig. 7 Secondary structure of *CsDREB-A4b* transcription factor from cultivar ‘Anjibaicha’ of *Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze.

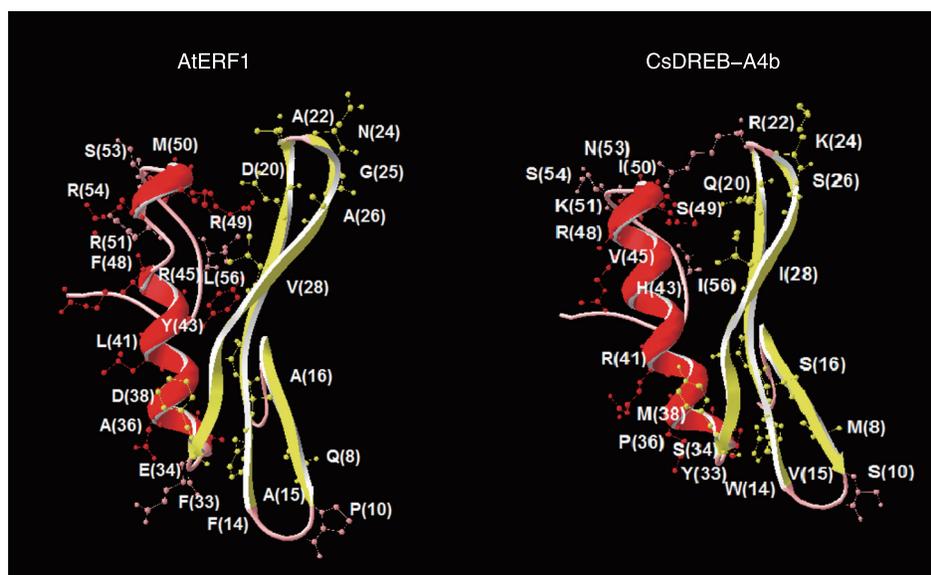


图 8 茶树品种‘安吉白茶’ *CsDREB-A4b* 转录因子与拟南芥 *AtERF1* 转录因子^[22]的三级结构比较

Fig. 8 Comparison on tertiary structures of *CsDREB-A4b* transcription factor from cultivar ‘Anjibaicha’ of *Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze. and *AtERF1* transcription factor from *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.^[22]

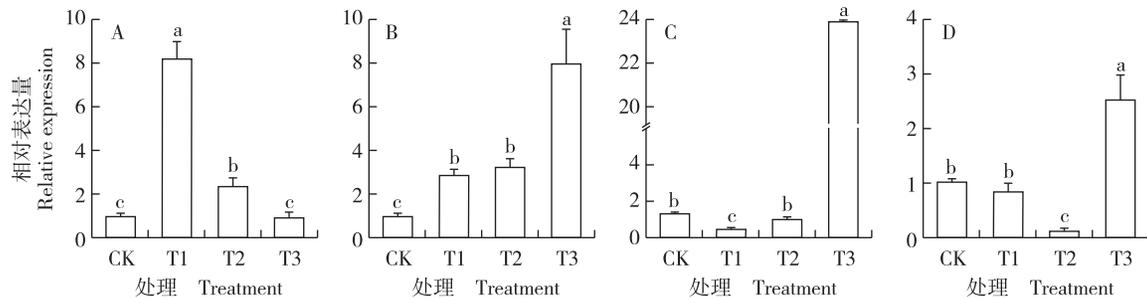
2.6 *CsDREB-A4b* 基因的表达分析

利用 qRT-PCR 对茶树品种‘安吉白茶’叶片中 *CsDREB-A4b* 基因在高温 (38 °C)、低温 (4 °C)、盐 (200 mmol · L⁻¹ NaCl) 和干旱 (200 g · L⁻¹ PEG) 胁迫

条件下的表达情况进行检测, 结果 (图 9) 表明: 在上述 4 种胁迫条件下, *CsDREB-A4b* 基因均可表达, 但其相对表达量在不同胁迫处理和胁迫时间下存在差异。高温胁迫处理组, 在胁迫 4 和 8 h *CsDREB-A4b* 基因

的相对表达量显著高于对照。低温胁迫处理组, *CsDREB-A4b* 基因的相对表达量随着胁迫时间的延长显著升高。盐胁迫处理组, 胁迫 4 h *CsDREB-A4b* 基因的相对表达量显著低于对照, 胁迫 8 h 其相对表达量与对照无显著差异, 胁迫 12 h 其相对表达量显著高于对照。干旱胁迫处理组, 胁迫 4 h 时 *CsDREB-A4b*

基因的相对表达量与对照无显著差异, 胁迫 8 h 时则显著低于对照, 而在胁迫 12 h 时显著高于对照。在高温、低温、盐和干旱胁迫条件下, *CsDREB-A4b* 基因的相对表达量分别在胁迫 4、12、12 和 12 h 达到最高, 分别为对照的 8.0、8.0、24.0 和 2.5 倍。



CK: 对照 The control; T1: 胁迫 4 h Stressing for 4 h; T2: 胁迫 8 h Stressing for 8 h; T3: 胁迫 12 h Stressing for 12 h.

不同的小写字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$) Different small letters indicate the significant difference among different treatments ($P < 0.05$).

图 9 在 38 °C 高温 (A)、4 °C 低温 (B)、200 mmol · L⁻¹ NaCl (C) 和 200 g · L⁻¹ PEG (D) 胁迫处理下茶树品种 ‘安吉白茶’ 叶片中 *CsDREB-A4b* 基因的相对表达量分析

Fig. 9 Analysis on relative expression of *CsDREB-A4b* gene in leaf of cultivar ‘Anjibaicha’ of *Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze. in 38 °C high temperature (A), 4 °C low temperature (B), 200 mmol · L⁻¹ NaCl (C) and 200 g · L⁻¹ PEG (D) stress treatments

3 讨论和结论

DREB/CBF 转录因子是植物体内一类很重要的转录因子, 能够识别并特异性结合干旱响应基因启动子 DRE/CRT 元件, 从而提高植物的抗逆性, 在植物响应低温、干旱和高盐等非生物逆境胁迫的分子应答过程中发挥重要作用^[23]。DREB/CBF 亚族又被分成 A1 至 A6 共 6 个组, 其中 A3 至 A6 组的比例高, 占整个 DREB/CBF 亚族的 75%^[6,24], 但仍未确定其在植物的逆境调控过程中的具体作用。

目前, DREB-A4 类转录因子相继在一些物种中被分离和克隆出来, 如陆地棉 (*Gossypium hirsutum* Linn.)^[25] 和拟南芥^[26], 并已证实其在低温胁迫时被诱导表达。在茶树中有关 DREB 类转录因子的研究也证实了其参与茶树的温度胁迫响应过程^[27]。茶树品种 ‘安吉白茶’ 是一种低温敏感型树种, 其有机物积累和茶叶品质受温度变化影响极大^[28-29]。本研究从 ‘安吉白茶’ 中克隆得到 *CsDREB-A4b* 基因, 且研究结果表明 *CsDREB-A4b* 转录因子属于 DREB 亚族 A4 组, 与多种植物 DREB 转录因子 AP2 结合域的氨基酸

序列同源性很高, 且该转录因子的三级结构与拟南芥 AtERF1 转录因子的相似程度较高, 虽然有 15 个差异位点, 但是这些差异位点对 *CsDREB-A4b* 转录因子的三级结构影响较小^[22]。

‘安吉白茶’ 叶片中 *CsDREB-A4b* 基因在高温、低温、盐和干旱胁迫处理下均可表达, 但相对表达量存在差异。在高温胁迫处理前期, *CsDREB-A4b* 基因的相对表达量显著高于对照, 而在低温胁迫处理下, 随着胁迫时间延长, 其相对表达量持续上升, 推测 *CsDREB-A4b* 基因在提高 ‘安吉白茶’ 耐寒性方面发挥作用。已有研究表明: 含有顺式作用元件 DRE 的诱导型启动子 rd29A 能有效提高植物对低温、干旱和高盐的耐受性^[23]。袁红雨等^[30] 认为, 茶树 *CsCBF1* 基因受低温快速诱导表达, 与本文中 *CsDREB-A4b* 基因表达有差异, 说明不同 DREB 类转录因子的功能具有差异性和复杂性。在盐胁迫处理下, 随着胁迫时间延长, *CsDREB-A4b* 基因的表达量呈先降低后升高的变化趋势, 可能是由于在 200 mmol · L⁻¹ NaCl 处理下, *CsDREB-A4b* 基因要经历 1 个启动期才能被诱导表达^[8]。*CsDREB-A4b* 基因在干旱胁迫下的表达与在盐胁迫下较为相似。杜洪伟等^[31] 认为 DREB 基因

受干旱胁迫诱导表达,能增强其耐旱性。由于转录因子功能的复杂性和茶树自身的特性,‘安吉白茶’中*CsDREB-A4b*转录因子在不同逆境中的调控机制还需要进一步多方面的分析和探讨。

参考文献:

- [1] 刘 强,张贵友,陈受宜. 植物转录因子的结构与调控作用[J]. 科学通报, 2000, 45(14): 1465-1474.
- [2] 赵利锋,柴团耀. AP2/EREBP 转录因子在植物发育和胁迫应答中的作用[J]. 植物学通报, 2008, 28(1): 89-101.
- [3] 韩志萍,安利佳,侯和胜. AP2/EREBP 转录因子的结构与功能[J]. 中国农学通报, 2006, 22(2): 33-38.
- [4] RIECHMANN J L, MEYEROWITZ E M. The AP2/EREBP family of plant transcription factors[J]. Biological Chemistry, 1998, 379: 633-646.
- [5] 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: 998-1009.
- [6] HONG J P, KIM W T. Isolation and functional characterization of the *Ca-DREB1P1* gene encoding a dehydration-responsive element binding-factor-like protein 1 in hot pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Pukang)[J]. Planta, 2005, 220: 875-888.
- [7] LIU Q, KASUGA M, SAKUMA Y, et al. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis[J]. The Plant Cell, 1998, 10: 1391-1406.
- [8] 杨 帆,丁 菲,杜天真. 盐胁迫下构树 DREB 转录因子基因表达的实时荧光定量 PCR 分析[J]. 林业科学, 2010, 46(4): 146-150.
- [9] 王呈玉,万 牲,翟凤艳,等. 短芒大麦 DREB1 转录因子的克隆与特性分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2009, 37(7): 59-67.
- [10] 周 伟. 玉米 DREB1/CBF 转录因子的克隆及其抗逆功能分析[D]. 长春: 吉林大学植物保护学院, 2013: 87-89.
- [11] 耿 芳,郭伟华,郭玉双,等. 烟草 DREB 转录因子新基因的克隆与功能分析[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2011, 37(1): 22-30.
- [12] 刘 琦,武晓东,郭金良,等. DREB 转录因子及其在大豆中的应用[J]. 大豆科技, 2008(4): 23-25.
- [13] 倪志勇,徐兆师,刘 丽,等. 小麦转录因子 *TaDREB6* 基因的克隆及鉴定[J]. 麦类作物学报, 2008, 28(3): 357-363.
- [14] 陈 暄,房婉萍,邹中伟,等. 茶树冷胁迫诱导抗寒基因 *CBF* 的克隆与表达分析[J]. 茶叶科学, 2009, 29(1): 53-59.
- [15] 邹中伟. 茶树冷胁迫诱导抗寒相关基因的分离与表达分析[D]. 南京: 南京农业大学园艺学院, 2009: 56-67.
- [16] 陈林波,李叶云,王 琴,等. 茶树冷诱导基因 *RAV* 的克隆与表达特性分析[J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(4): 354-358.
- [17] 谢文钢,邵济波,韩 楠,等. 安吉白茶的研究进展[J]. 福建茶叶, 2011(6): 4-7.
- [18] 王新超,赵丽萍,姚明哲,等. 安吉白茶正常与白化叶片基因表达差异的初步研究[J]. 茶叶科学, 2008, 28(1): 50-55.
- [19] HUA S, SUN Z. Support vector machine approach for protein subcellular localization prediction[J]. Bioinformatics, 2001, 17: 721-728.
- [20] BRAMEIER M, KRINGS A, MACCALLUM R M. NucPred: predicting nuclear localization of proteins[J]. Bioinformatics, 2007, 23: 1159-1160.
- [21] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25: 402-408.
- [22] ALLEN M D, YAMASAKI K, OHME-TAKAGI M, et al. A novel mode of DNA recognition by a β -sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA[J]. The EMBO Journal, 1998, 17: 5484-5496.
- [23] AGARWAL P K, AGARWAL P, REDDY M K, et al. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants[J]. Plant Cell Reports, 2006, 25: 1263-1274.
- [24] JAGLO K R, KLEFF S, AMUNDSEN K L, et al. Components of the Arabidopsis C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species[J]. Plant Physiology, 2001, 127: 910-917.
- [25] HUANG B, LIU J Y. Cloning and functional analysis of the novel gene *GhDBP3* encoding a DRE-binding transcription factor from *Gossypium hirsutum* [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2006, 1759: 263-269.
- [26] WEI G, PAN Y, LEI J, et al. Molecular cloning, phylogenetic analysis, expressional profiling and *in vitro* studies of TINY2 from *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 38: 440-446.
- [27] 刘志薇,吴致君,黎星辉,等. 茶树 *CsDREB-A1* 转录因子基因的克隆及其特性分析[J]. 植物资源与环境学报, 2014, 23(4): 8-16.
- [28] 王世斌. 安吉白茶叶绿素含量的规律性研究[J]. 浙江农业科学, 2011(6): 1269-1272.
- [29] 李叶云,庞 磊,陈启文,等. 低温胁迫对茶树叶片生理特性的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2012, 40(4): 134-138.
- [30] 袁红雨,朱小佩,曾 威,等. 茶树 *CsCBF1* 基因克隆和转录活性分析[J]. 西北植物学报, 2013, 33(9): 1717-1723.
- [31] 杜洪伟,陈 芬,肖国樱. 提高作物耐旱性的 DREB 转录因子研究进展[J]. 生物技术通报, 2008(6): 1-6.

(责任编辑:张明霞)