

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2023.05.001

茶树 *CsAS1* 和 *CsAS2* 基因的克隆及功能分析

袁连玉, 张丽, 童华荣, 代洪苇, 郑姝婷

西南大学 食品科学学院, 重庆 400715

摘要: 叶片是植物进行光合作用等代谢过程的重要场所, 所以对其形态建成及发育过程的研究非常重要. AS 蛋白能够参与叶片极性建立的调控, 但关于茶树 AS 蛋白的研究还较少. 本研究从“福鼎大白茶”茶树中克隆获得了 2 个 AS 蛋白基因: *CsAS1* 和 *CsAS2*, 编码蛋白长度分别为 344 aa 和 229 aa, 理论等电点分别为 10.04 和 7.36, 分别分布在第 4 和 10 号染色体上, 均定位于细胞核; 系统进化树和保守结构域分析表明, *CsAS1* 和 *CsAS2* 蛋白间氨基酸序列和空间结构高度保守, 且分别与葡萄和水稻的 AS 蛋白亲缘最近; *CsAS1* 和 *CsAS2* 在茶树中的表达模式分析显示, *CsAS1* 基因在茶树芽中的表达量最高, *CsAS2* 基因在茶树根中的表达量最高, 且 *CsAS1* 和 *CsAS2* 基因在茶树一芽二叶中的表达量均受到外源 IAA 和 GA₃ 的诱导表达; 启动子元件和转录组数据分析结果显示, *CsAS1* 和 *CsAS2* 基因启动子序列中均含有多个非生物逆境胁迫响应的元件, 且受到不同逆境胁迫的抑制或诱导表达. 综上所述, *CsAS1* 和 *CsAS2* 基因可参与茶树叶片的形态建成及非生物逆境胁迫的响应过程, 可为进一步研究 *CsAS1* 和 *CsAS2* 基因在茶树叶片极性建立及叶片发育过程中的功能提供理论参考.

关键词: 茶树; *CsAS*; 基因克隆; 叶片形态建成; 表达分析

中图分类号: Q786; Q943.2; S571.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2023)05-0002-11

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Cloning and Functional Analysis of *CsAS1* and *CsAS2* Genes in Tea Plant

YUAN Lianyu, ZHANG Li, TONG Huarong,
DAI Hongwei, ZHENG Shuting

College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Leaf is important place for photosynthesis and other metabolic processes in plants, and research of its morphogenesis and development processes are very crucial. AS protein can participate in the leaf polarity establishment. However, the studies on AS protein in tea plant were relatively few. In this study, two AS protein genes, *CsAS1* and *CsAS2* were identified and cloned from ‘Fuding Dabaicha’ plant, enco-

收稿日期: 2023-03-15

基金项目: 重庆市技术创新与应用发展专项重点项目(CSTB2022TIAD-CUX00211); 重庆市农业农村委员会重庆市现代山地特色高效农业茶产业技术体系(2022-8); 西南大学大学生创新创业训练计划项目(X202210635296).

作者简介: 袁连玉, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事茶树种质资源鉴定及创新研究.

通信作者: 童华荣, 博士, 教授, 博士研究生导师.

ding 344 aa and 229 aa, respectively. The pI of *CsAS1* and *CsAS2* were 10.04 and 7.36, respectively. *CsAS1* and *CsAS2* were distributed on chromosome 4 and 10, respectively, and both *CsAS1* and *CsAS2* located in the nucleus. Phylogenetic analysis and conserved domain analysis showed that *CsAS1* and *CsAS2* were highly conserved in amino acid sequence and space structures of the proteins, and had the closest protein affinity to grape and rice, respectively. The results of expression analysis showed that the highest level of *CsAS1* expression was in the bud, and the highest level of *CsAS2* expression was in the root. Moreover, the expressions of *CsAS1* and *CsAS2* in the shoot tip with one bud and two leaves were induced by exogenous IAA and GA₃ treatment. The analysis of promoter and transcriptome data showed that the both promoter sequences contained multiple abiotic stress response elements, and expressions of *CsAS1* and *CsAS2* were inhibited or induced by different stresses. In summary, *CsAS1* and *CsAS2* could participate in the morphogenesis of leaves and the process of abiotic stress response in tea plants, which could provide the reference for further research on the function of *CsAS1* and *CsAS2* in the polarity of tea leaves and leaf development.

Key words: tea plant; CsAS; Gene cloning; leaf morphogenesis; expression analysis

叶片是植物的主要营养器官,是植物光合作用和蒸腾作用等生理代谢过程的重要场所.叶片的发育过程是非常关键的植物形态建成过程,受生理和外界环境等多种因素的综合调控^[1].叶片的发育过程主要包括叶片的发生、叶片的形态特征决定和叶片的极性分化3个重要过程.叶片的极性分化包括即背-腹轴(近-远轴极性)、基-顶轴和中-侧轴3个方向的分化^[2-3],其中近-远轴极性的建立能够决定叶片背腹特征的形成,形成叶片背侧的海绵组织和腹侧的栅栏组织的分化,使得叶片由辐射对称变成两侧对称,这是叶片发育的关键过程之一,是保障叶片正常进行光合作用、蒸腾作用等重要生理过程的结构基础^[4-6].

多种转录调控因子相互协调表达形成复杂的调控网络,共同调控了叶片的近-远轴极性的建立过程,其中 *HD-ZIP* 基因家族(包括 *REVOLUTA*、*PHAVOLUTA* 和 *PHABULOSA* 基因)、*ARP* 基因家族(*ASYMMETRIC LEAVES1* (*AS1*))、玉米 *ROUGH SHEATH* (*RS2*)及金鱼草 *PHAN* 基因)和 *LOB* (*AS2*)基因家族是主要参与叶片近轴极性建立的重要基因^[7]; *KANADI* 基因家族(*KAN1-4*)和 *ARF* 基因家族(*ARF3* 和 *ARF4*)主要参与叶片的远轴极性建成^[8];小RNA包括的 siRNAs、ta-siRNAs 和 miRNAs 等也可通过调控靶基因的表达参与植物叶片的近-远轴极性的建成^[9-10]. *ASYMMETRIC LEAVES 1* (*AS1*)和 *ASYMMETRIC LEAVES 2* (*AS2*)互为等位基因,编码形成的 *AS1* 与 *AS2* 蛋白均可形成转录因子复合体参与叶片近-远轴极性的建成过程. *AS1* 属于 *ARP* 蛋白家族,是一类 MYB-R2R3 型转录因子,是参与 DNA 结合的结构蛋白^[11]; *AS2* 蛋白属于植物特有的 Lateral Organ Boundaries(*LOB*)蛋白家族,在植物中广泛存在,能够直接或间接参与植物生长发育及环境响应的转录调控过程^[12-14]. *AS1* 和 *AS2* 基因的突变会导致叶片褶皱、叶片不对称和叶边缘下卷等叶片缺陷的症状; *AS1* 和 *AS2* 基因的超表达则会使叶片出现叶片边缘上卷和叶片收缩等近似近轴化极性的特征^[15]. *AS1* 和 *AS2* 基因家族还参与调控植物的其它发育和抗逆境胁迫等代谢调控过程,如茎的发育、维管束和根的发育等过程^[16-17].

茶树是我国重要的叶用经济作物,叶片的发育及形态建成直接影响茶叶的产量和质量,所以研究茶树叶片发育调控机制对提高茶树经济价值的重要意义.目前,茶树中 *AS1* 和 *AS2* 基因还未被关注,本研究从茶树基因组中鉴定克隆了 *CsAS1* 和 *CsAS2* 基因,对其进行了全面的生物信息学分析和表达分析,可为进一步研究 *CsAS1* 和 *CsAS2* 基因家族在茶树叶片发育过程中的重要功能提供借鉴.

1 材料与方法

1.1 材料

茶树材料为2年生“福鼎大白茶”(Camellia sinensis cv. Fuding Dabaicha),种植于重庆市北碚区天生

路 2 号西南大学校内教学实验基地。转录组表达数据下载于“舒茶早”茶树基因组数据库 TPIA(<http://tp-db.shengxin.ren/>)。用于表达分析的茶树不同组织材料,包括成熟叶、茎、根及花等,取于“福鼎大白茶”,液氮速冻后,存储于一 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱。试验试剂和材料主要包括:植物 RNA 提取试剂盒(产于天根生化科技(北京)有限公司)、反转录酶及配套缓冲液(产于宝生物工程(大连)有限公司)、Taq DNA 聚合酶、pMD18-T、DH5 α 大肠杆菌感受态细胞、DNA 切胶回收试剂盒(产于上海源叶生物科技有限公司)和荧光定量 PCR 试剂超混液(产于重庆鼎国生物技术有限公司)。引物合成和基因测序由生工生物工程(上海)有限公司完成。

1.2 茶树 CsAS1 和 CsAS2 基因的克隆

按照植物 RNA 提取试剂盒说明书的步骤,分别提取“福鼎大白茶”茶树的根、茎材料的总 RNA,采用反转录试剂盒进行 mRNA 的反转录,合成不同组织的 cDNA,作为基因克隆及表达分析的材料。克隆茶树 AS1 和 AS2 基因的 PCR 扩增体系为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 s; $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 s; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 min; 35 个循环后, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 min, DNA 纯化试剂盒进行纯化回收测序和分析。所有使用的引物详情见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 引物信息表

引物名称	引物序列	用途
CsAS1	5'- ATGAAGGAGAGGCAGCGCTGG -3'和 5'- TCACCGACCATTATGCTCGGC -3'	基因克隆
CsAS2	5'- ATGGCAATGACATCATCATCA -3'和 5'- CTAAGAAGGACCAATGGCTTT -3'	
CsAS1-RT	5'- AGCGCCTTGTCATCCGTCTT-3'和 5'- TCAGGTCTGACTTGCCGTCC-3'	荧光定量 PCR
CsAS2-RT	5'- TCGGAGCCAGCAATGTCACT-3'和 5'- GGGAGATGACTCCGACGCAA-3'	

1.3 茶树 CsAS1 和 CsAS2 蛋白的生物信息学分析

分别从拟南芥数据库 TAIR 和 JGI-Phytozome 13 数据库(<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/blast-search>)中下载 CsAS 基因在 9 种不同植物中的核苷酸和蛋白质序列,利用 TPIA 数据库工具进行 Blast 搜索,鉴定茶树 CsAS 基因,并进行了编码蛋白的分子量、等电点的蛋白性质分析;分别采用 SOPM 和 SWISS-MODEL 软件分析了 CsAS1 和 CsAS2 蛋白的结构;用 Clustal X1.8, MEGA 4.0 和 DNAMAN 等生物学软件分析了茶树 CsAS 蛋白的氨基酸序列,采用邻接法(Neighbor-joining)方法构建进化树,Bootstrap 参数为 1 000,其余参数设置为默认值;分别通过 MEME、Plant-mPLoc 和 Plantcare 软件分析了茶树 CsAS 蛋白的保守基序(基序数量设为 5)、亚细胞定位和 CsAS 基因上游 2 kb 启动子序列中含有的顺式作用元件;利用模式植物拟南芥 ATAS 蛋白的相互作用网络,在数据库 STRING 中建立了茶树 CsAS 蛋白的相互作用关系网络。

1.4 茶树 AS 受体蛋白基因的表达分析

本研究从 TPIA 数据库中下载了茶树叶片中 CsAS 基因在盐、冷、干旱和 MeJA 等不同非生物逆境胁迫条件下的转录表达水平的数据,并利用 Ttools 绘制热图。为了验证数据库中的基因表达量,本研究还采用荧光定量 PCR 的方法检测 CsAS 基因在茶树 5 个组织部位(花、芽、成熟叶、茎、根)、不同发育时期的芽、不同叶位的叶片及在外源 GA $_3$ 、IAA 处理条件下的表达量。本研究采用水培的方式对 2 年生“福鼎大白茶”扦插苗进行外源激素胁迫处理,分析了 CsAS 基因的表达特异性,每盆 24 株,在盆中加入配制好的响应的营养液,加气泵通入氧气,每 7 天更换一次营养液,MS 培养 30 天后进行 MS/(100 mg/L)GA $_3$ 和 MS/(50 mg/L)IAA 胁迫处理,分别在 24 h 和 48 h 后取样,液氮固样, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。采用艾德莱植物 RNA 提取试剂盒进行样本的总 RNA 的提取,并反转录成 cDNA 模板,用于 CsAS 基因表达特异性分析。用 Primer 3 软件设计荧光定量引物(表 1),内标基因为茶树肌动蛋白基因 *Actin1*。10 μL Real-Time PCR 反应体系为: SsoFast EvaGreen Supermix 5 μL , 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的上下游引物各 0.20 μL , cDNA 1 μL , ddH $_2\text{O}$ 3.5 μL , 充分混匀,于 Bio-Rad CFX 96 实时定量 PCR 仪上进行扩增分析,反应程序为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 s; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 s; $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 s, 进行 40 个循环。每个样品进行 3 次生物学重复和 3 次试验重复,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分析结果,分别使用 SPSS 和 ORIGIN 软件进行差异显著性分析和作图。

2 结果与分析

2.1 茶树 AS 蛋白基因的鉴定及克隆

本研究利用模式植物中 AS 蛋白的核苷酸和氨基酸序列信息, 在茶树基因组数据中进行本地 Blast 搜索鉴定, 共获得茶树中同源的 AS1 和 AS2 蛋白基因各 1 个: *CsAS1* 和 *CsAS2*. 如图 1, 本研究分别以“福鼎大白茶”茶树茎和根为材料获得的 cDNA 为模板, 克隆获得了 *CsAS1* 和 *CsAS2* 基因, 长度分别为 1 033 bp 和 688 bp. 如表 2, *CsAS1* 和 *CsAS2* 基因分别编码 344 aa 和 229 aa 长度的氨基酸残基, 分子量分别为 39.45 和 25.33; 蛋白的等电点分别为 10.04 和 7.36; 亚细胞定位预测分析显示 2 个 AS 蛋白均定位于细胞核, 这与其它植物中的 AS 蛋白的定位模式一致. 如图 2, 染色体定位分析结果显示 2 个 *CsAS* 基因分别定位于茶树的 4 号和 10 号染色体上.

表 2 茶树 *CsAS1* 和 *CsAS2* 蛋白的理化性质

基因名称	基因编号	基因位置	编码区 长度/bp	氨基酸 数目/aa	分子量/ KD	等电点	亚细胞 定位
<i>CsAS1</i>	TEA018036	Scaffold1700: 815531-816565+	1 033	344	39.45	10.04	细胞核
<i>CsAS2</i>	TEA031548	Scaffold1308: 667263-667964+	688	229	25.33	7.36	细胞核

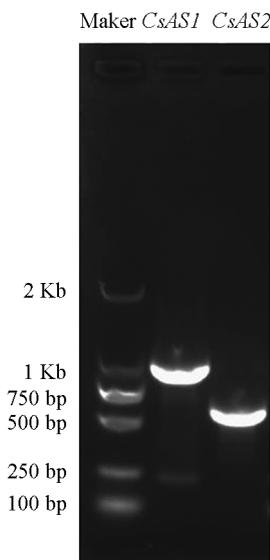


图 1 *CsAS1* 和 *CsAS2* 基因的 PCR 扩增

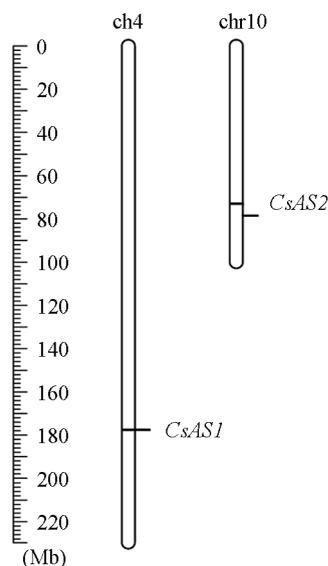
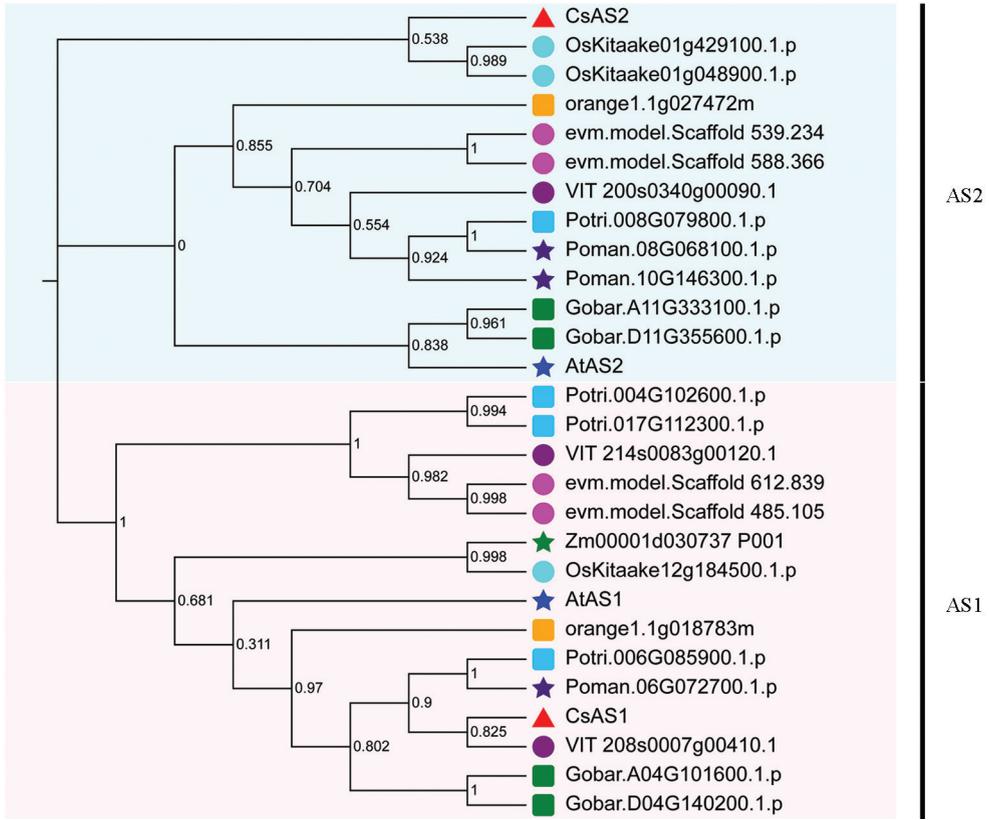


图 2 *CsAS1* 和 *CsAS2* 基因的染色体定位

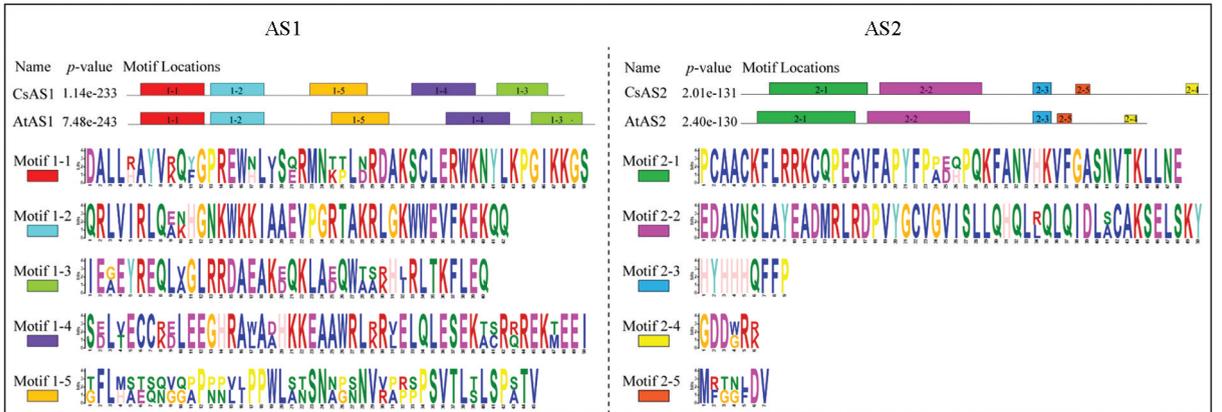
2.2 茶树 *CsAS1* 和 *CsAS2* 蛋白系统进化及蛋白保守结构域分析

系统进化树分析结果显示(图 3), 茶树 *CsAS1* 和 *CsAS2* 蛋白与其它植物中的该类蛋白氨基酸序列具有高度的保守性, 茶树 *CsAS1* 蛋白与葡萄 VitAS 蛋白的亲缘关系最近, 而 *CsAS2* 与水稻 OsAS 蛋白的亲缘关系最近. 保守基序分析显示(图 4a), AS1 和 AS2 蛋白在不同植物中均具有高度的保守性, 不同植物 *CsAS1* 和 *CsAS2* 蛋白序列中保守基序的种类和数量也高度一致, 但 *CsAS1* 和 *CsAS2* 蛋白之间差异比较明显, 分属于不同的亚家族. 基因结构分析显示(图 4b), *CsAS1* 基因只有 1 个外显子, *CsAS2* 基因含有 2 个外显子和 1 个内含子. *CsAS1* 蛋白属于 ARP 蛋白家族, *CsAS2* 蛋白属于 LOB 蛋白家族. 多种植物的 AS1 和 AS2 蛋白的多序列比对结果显示(图 5), 不同植物中 AS1 蛋白序列一致性为 64.91%, AS2 蛋白的一致性为 53.69%; *CsAS1* 蛋白氨基酸序列中含有 2 个保守的 DNA 结合结构域: DNA 结构域 I 和 II; *CsAS2* 蛋白氨基酸序列中含有 LOB 家族蛋白所共有的半胱氨酸结构域 CX2CX6CX3C(ZF 基序)、GAS(Gly-Ala-Ser)、负责蛋白质二聚体的类亮氨酸拉链的螺旋基序 LX6LX3LX6L、ICG 和 LZL 等特殊结构域, 均与该蛋白家族的功能有直接关系. 茶树的 *CsAS1* 和 *CsAS2* 蛋白均为典型的 AS 蛋白, 推测可能与已经报道的其它植物 AS 蛋白具有相似生物学功能.

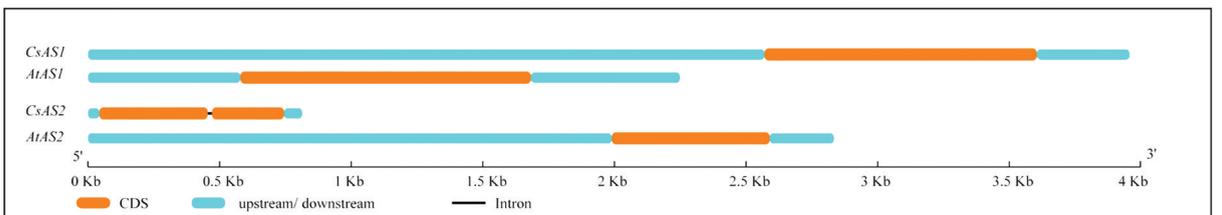


At 为拟南芥, Os 为水稻, Zm 为玉米, VIT 为葡萄, Potri 为杨树, Poman 为小黑树, Gobar 为陆地棉, orange 为柑橘, evm 为咖啡, CsAS 为茶树.

图 3 植物中 AS 蛋白的进化树分析



a.



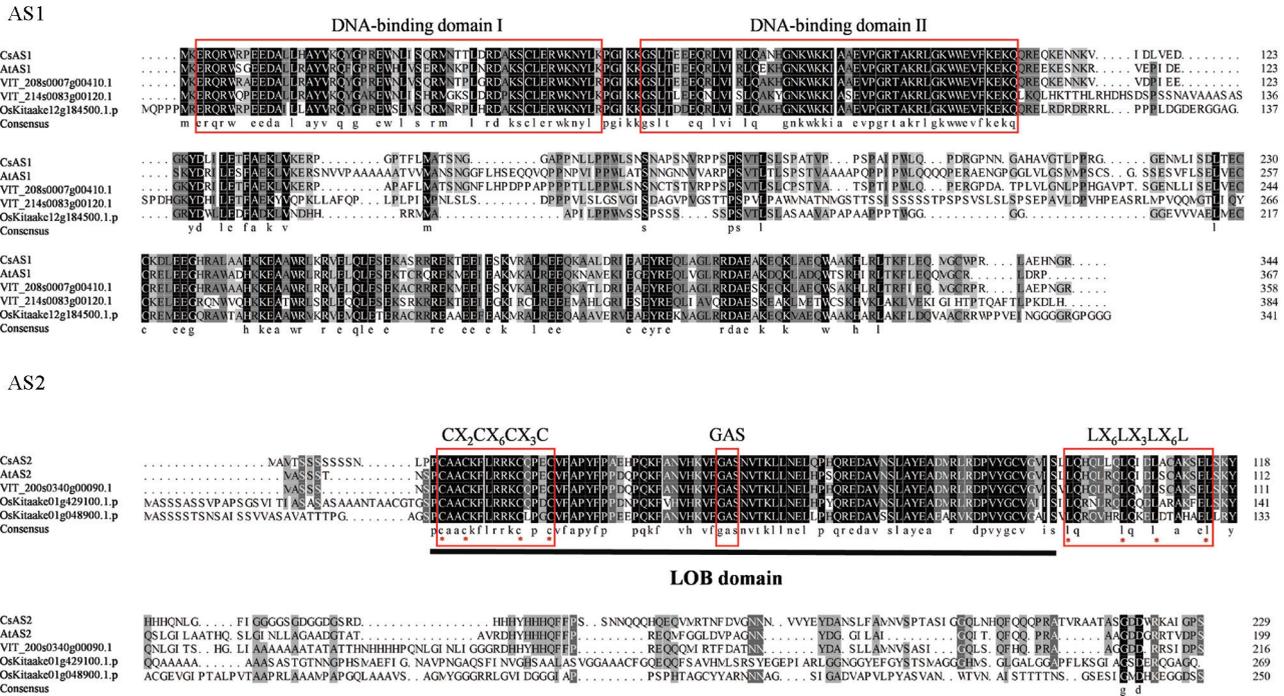
b.

(a) AS 蛋白保守基序分析, 不同颜色的方块和数字代表不同的保守基序, 不同颜色的字母代表保守基序的氨基酸序列信息. (b) AS 基因结构分析. AtAS 为拟南芥 AS 蛋白, CsAS 为茶树 AS 蛋白.

图 4 植物中 AS 蛋白家族的保守基序分析及 CsAS 基因结构分析

一 为LOB家族的保守结构域LOB(CX2CX6CX3C、GAS和LX6LX3LX6L)的序列及位置

□ 表示保守结构域



At 为拟南芥, Os 为水稻, VIT 为葡萄, Cs 为茶树.

图 5 茶树 CsAS 与其它植物 AS 氨基酸序列对比

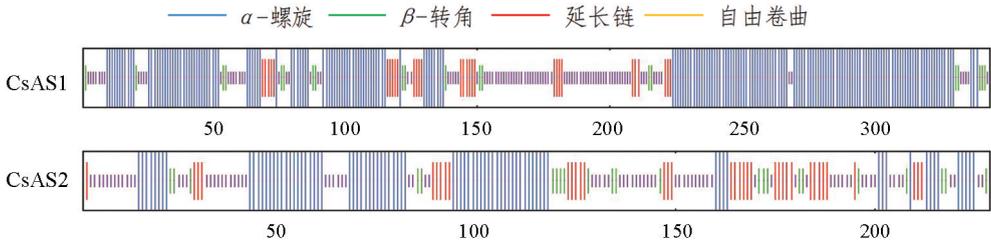
2.3 茶树 CsAS1 和 CsAS2 蛋白的二、三级结构分析

蛋白空间结构分析显示(图 6a), 茶树 CsAS1 蛋白中 α -螺旋所占的比例最大, 为 56.69%, 其次是自由卷曲, 为 28.78%, 延长链和 β -转角所占的比例小; CsAS2 蛋白中 α -螺旋和自由卷曲所占的比例均较大, 分别为 36.68% 和 36.24%, 延长链和 β -转角所占的比例较小. 分别以已知蛋白 MYB21 和 LOB 蛋白为模板, 用 SWISS-MODEL 软件构建的蛋白三级结构显示, CsAS1 和 CsAS2 蛋白中均含有大量的 α -螺旋和自由卷曲, 但三级空间结构不同, 差异较大, 均与同源的拟南芥 AS 蛋白结构相似. 由此可推测 CsAS 蛋白与模式植物中的 AS 蛋白具有相同的生物学功能.

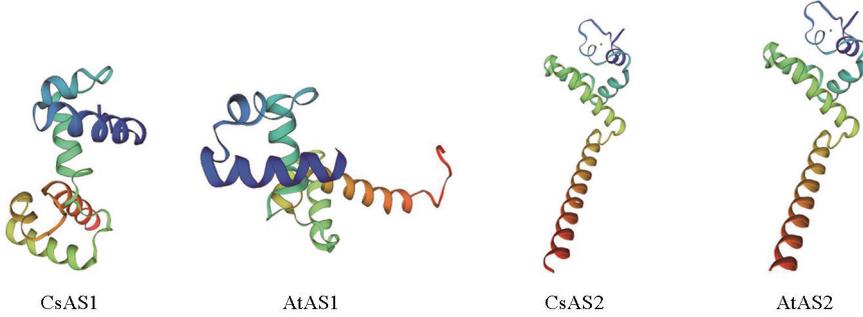
2.4 茶树 CsAS1 和 CsAS2 基因的时空表达特异性分析

为明确 CsAS1 和 CsAS2 蛋白在茶树叶片和其它器官生长发育中的调控功能, 本研究利用 Real-time PCR 的方法分析了 CsAS1 和 CsAS2 基因在茶树根、茎、叶、花和芽等不同组织部位的表达特异性.

如图 7a, CsAS1 基因在茶树不同组织中均有表达, 但在芽中的表达量远远高于其它组织; 而 CsAS2 基因在茶树不同组织中均有表达, 但在根中的表达量远远高于其它组织. 如图 7b, CsAS1 和 CsAS2 基因在芽的不同发育时期中随着成熟度的增加均有先增加再减少的趋势. 如图 7c, CsAS1 基因在叶片不同发育时期中随着成熟度的增加而减少, 在幼嫩芽叶中的表达高于第一、二和三叶; CsAS2 基因在叶片不同时期发育先降低, 再恢复到在芽中的表达水平, 在幼嫩芽叶和第三叶中的表达高于第一、二和三叶. 由此推测茶树 CsAS1 和 CsAS2 基因在茶树不同组织和叶片不同发育阶段发挥着不同的功能.

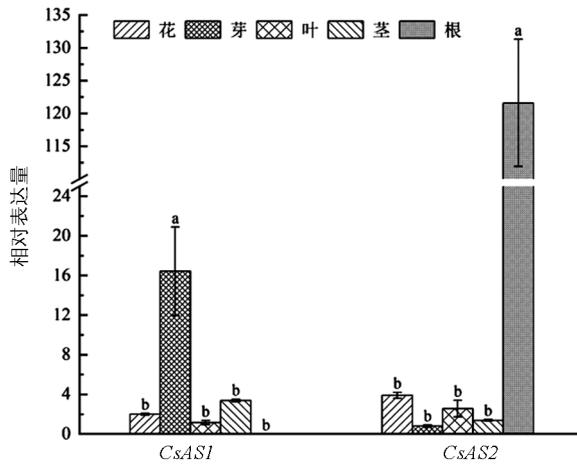


a. 茶树CsAS1和CsAS2蛋白的二级结构

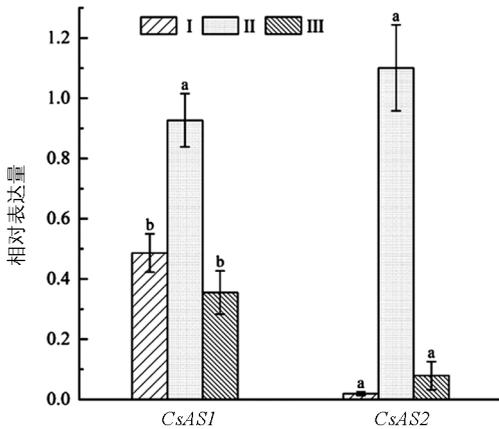


b. 茶树CsAS1和CsAS2蛋白的三级结构

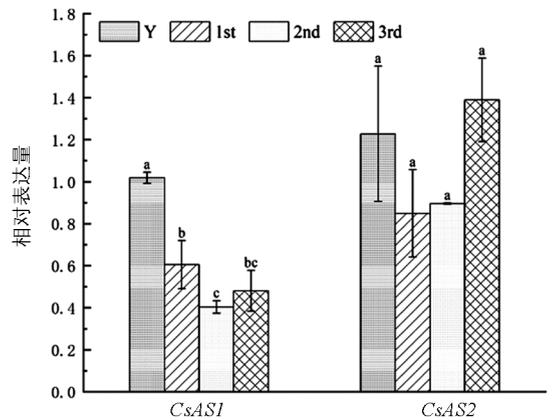
图 6 茶树 CsAS1 和 CsAS2 蛋白结构分析



a.



b.



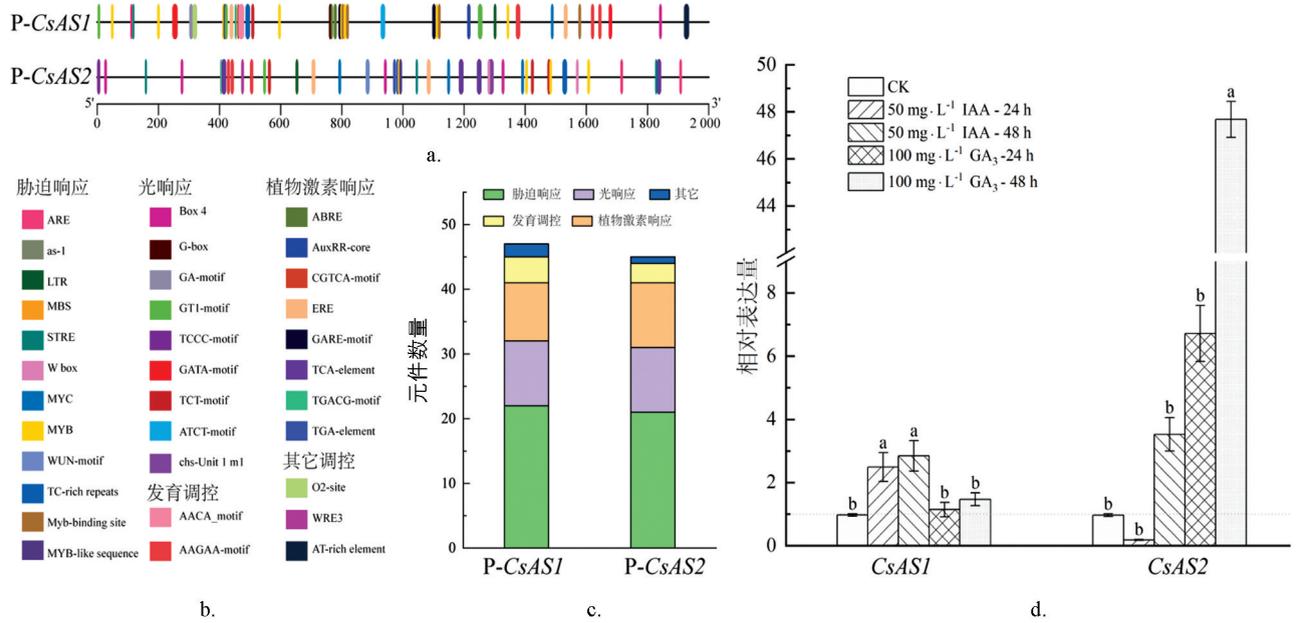
c.

(a) CsAS1 和 CsAS2 基因在茶树不同组织的表达分析。(b) CsAS1 和 CsAS2 基因在茶树芽不同发育时期的表达分析。(c) CsAS1 和 CsAS2 基因在茶树不同叶位的表达分析。小写字母不同表示 $p < 0.05$, 差异具有统计学意义。

图 7 CsAS1 和 CsAS2 基因的表达分析

2.5 茶树 *CsAS1* 和 *CsAS2* 基因启动子片段顺式作用元件分析

为分析茶树 *CsAS1* 和 *CsAS2* 基因的潜在功能, 通过 Plant Care 软件分析了 *CsAS1* 和 *CsAS2* 基因的启动子序列. 结果如图 8 所示, *CsAS1* 和 *CsAS2* 基因启动子序列中均含有多个顺反子元件, 主要包括胁迫响应元件(MYB、MYC)、光响应元件、植物激素响应元件和发育调控元件. 其中胁迫响应元件占比比较大, 植物激素响应元件也有较多存在. 由此推测 *CsAS1* 和 *CsAS2* 基因可参与茶树对非生物逆境和植物激素的响应过程. 为了验证这两个基因能够参与植物激素的调控过程, 本研究分析了 *CsAS1* 和 *CsAS2* 基因在外源激素胁迫条件下的表达特性, 如图 8d 所示, 在 50 mg/L IAA 处理 24 h 和 48 h 后, *CsAS1* 基因受到诱导, 有较大幅度的表达量增加, *CsAS2* 基因在 24 h 时减少, 48 h 时增加; 在 100 mg/L GA₃ 处理 24 h 和 48 h 后, *CsAS1* 和 *CsAS2* 基因均受到诱导, 但 *CsAS1* 增加的表达量相对比较少, *CsAS2* 基因的表达被明显诱导, 增加量接近 50 倍.

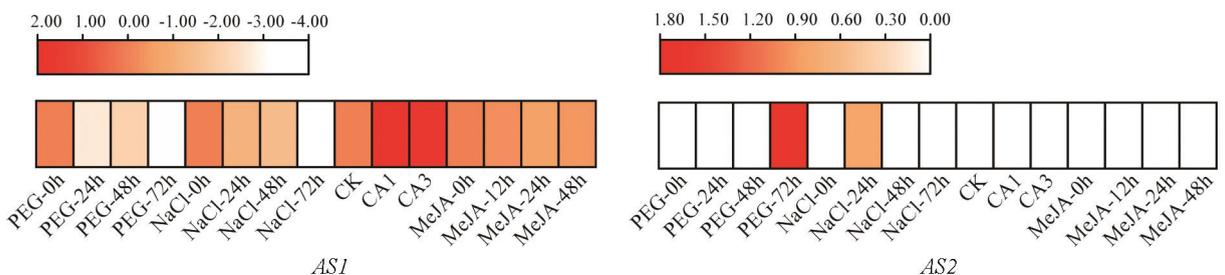


(a-c) 启动子元件分析. (d) *CsAS1* 和 *CsAS2* 基因在不同外源 GA₃、IAA 激素处理胁迫下的表达分析. 小写字母不同表示 $p < 0.05$, 差异有统计学意义.

图 8 茶树 *CsAS1* 和 *CsAS2* 基因启动子片段顺式作用元件分析

2.6 茶树 *CsAS1* 和 *CsAS2* 基因响应非生物逆境胁迫的表达特异性分析

本研究利用 TPIA 已经公布的转录组数据分析了 *CsAS1* 和 *CsAS2* 基因在 NaCl、干旱、MeJA 和冷等不同非生物逆境胁迫条件下的表达分析. 如图 9 所示, *CsAS1* 基因可以被 NaCl、干旱、MeJA 和冷胁迫诱导表达, 其中被冷驯化后表达上调, 而在其余 3 种胁迫后表达下调; *CsAS2* 基因仅在干旱处理 72 h 和 NaCl 处理 24 h 后被诱导, 且表达上调. 由以上结果可以推测, 茶树 *CsAS1* 和 *CsAS2* 基因可能参与茶树应对环境中盐、干旱和冷等非生物逆境胁迫的响应过程.



利用 PEG 模拟干旱胁迫; 图例中正数表示上调表达, 负数表示下调表达; 图下方为不同胁迫处理及其对照.

图 9 茶树 *CsAS1* 和 *CsAS2* 基因在不同逆境胁迫下的表达分析

2.7 茶树 CsAS1 和 CsAS2 的蛋白关联蛋白分析

利用拟南芥同源的 AtAS 蛋白进行了 CsAS 蛋白的关联蛋白预测分析,如图 10 所示,茶树 CsAS1 和 CsAS2 的蛋白与多种叶片形态建成相关的蛋白间均存在关联性,其中包含 KNAT1(knotted1-like homeobox protein), KNAT2(knotted2-like homeobox protein), KAN(Homeodomain-like superfamily protein), LOB(Lateral organ boundaries domain family protein), TCP14(TEOSINTE BRANCHED、cycloidea and PCF 14), TCP15(TEOSINTE BRANCHED、cycloidea and PCF 15), AFO(Plant-specific transcription factor YABBY family protein)和 HDA6(Histone deacetylase 6)等蛋白.由此可推测, CsAS1 和 CsAS2 蛋白是可以参与茶树叶片形态建成过程的.

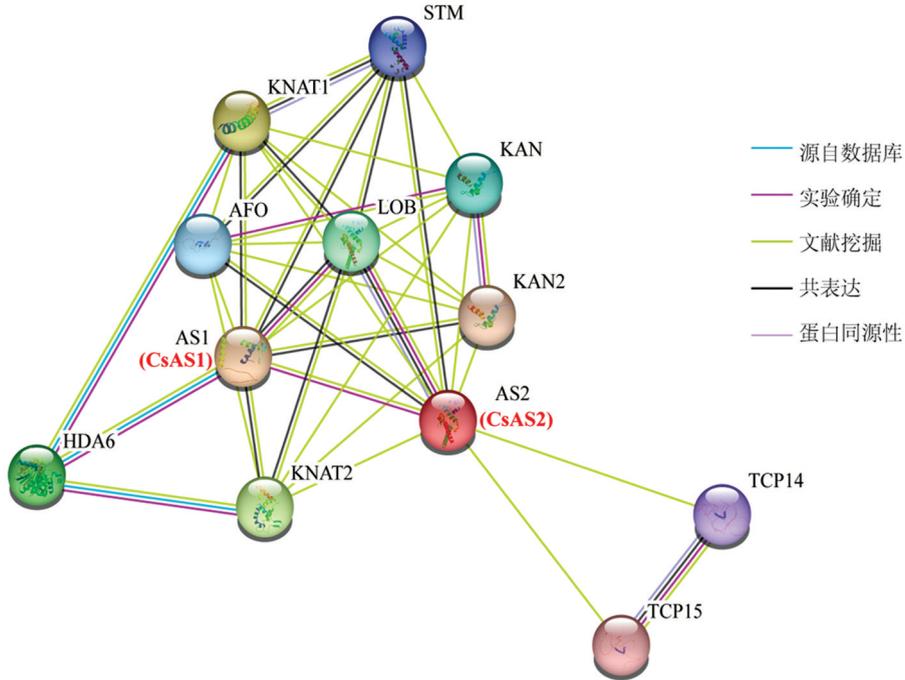


图 10 茶树 CsAS1 和 CsAS2 相互作用蛋白网络分析

3 讨论

茶树是叶用经济作物,其叶片的形态建成也存在形态的多样性,例如,叶片的大小、厚度和颜色等.其中茶树叶片的内卷和外卷等与叶片极性建立相关的现象同样也经常观察到.但目前茶树分子生物学的重点依旧在叶片的次生代谢和颜色调控上,对于叶片发育的关注度还不够.众多转录因子参与了叶片发育和形态建成过程^[18, 19]. AS 蛋白已经在多种植物中被报道参与叶片的近-远轴极性建立过程, AS 基因的变异或缺失会导致叶片的卷曲、外翻或者内卷等叶片去极性特征^[8, 20-21].本研究从“福鼎大白茶”茶树中克隆获得了 2 个与叶片发育有着紧密相关性的基因: CsAS1 和 CsAS2,其分子量、等电点和编码区长度与已经报道的 AS 蛋白具有高度的同源性,且均定位于细胞核(表 2).茶树 CsAS1 和 CsAS2 的氨基酸序列与水稻和葡萄等植物的该类蛋白高度相似,分别含有植物 ARP 蛋白的保守结构域(DNA 结合结构域 I 和 II)和 LOB 家族蛋白的保守结构域(半胱氨酸结构域 CX2CX6CX3C 即 ZF 基序, GAS, ICG 和 LZL 区域,负责蛋白质二聚体的类亮氨酸拉链的螺旋基序 LX6LX3LX6L)等特殊功能结构域.其中, ZF 基序是 AS2 蛋白结合 DNA 活性所必需的, ICG 和 LZL 区域是 AS2 核定位的必要区域^[22-24],说明茶树 CsAS1 和 CsAS2 蛋白具备发挥该类蛋白功能的基础序列元件. CsAS1 和 CsAS2 基因在叶片不同发育时期中随着成熟度的增加而减少,在幼嫩芽叶中的表达量高于第一、二和三叶; CsAS1 和 CsAS2 基因在芽的不同发育时期中随着成熟度的增加均有先增加后减少的趋势.以上结果可说明 CsAS1 和 CsAS2 蛋白具备其它植物中报道的 AS1 和 AS2 蛋白的相似功能,可参与叶片发育中的近-远轴极性建立的调控.

AS 转录因子蛋白家族还被报道广泛参与调控植物除叶片外的其它组织器官的发育和非生物逆境胁迫

响应等调控过程,例如拟南芥的 AS1 蛋白可以负调控 ABA 代谢途径^[25, 26],马铃薯 AS2 蛋白有利于提高其应对高盐、干旱、高温、低温等非生物胁迫的能力^[16]。启动子顺式作用元件和表达分析发现,茶树 CsAS1 和 CsAS2 基因的启动子序列中均含有多个逆境胁迫响应元件,茶树 CsAS1 基因的表达会被 NaCl、MeJA 和干旱胁迫抑制,可能存在负调控关系;在冷胁迫条件下, CsAS1 基因的表达被上调,是正调控的关系; CsAS2 基因的表达可被干旱胁迫和 NaCl 处理诱导。茶树 CsAS2 基因在根中的表达量远高于其它组织,与玉米 LOB 家族蛋白 RTCS 和 RTCL 基因类似,可能能够参与侧根及卷须根的形成调控过程^[27]。

AS 蛋白发挥生长发育调控功能是通过与其它蛋白形成复杂的网络而完成的。茶树 CsAS1 和 CsAS2 的蛋白可与多种叶片形态建成相关的蛋白间存在关联性,通过与 KNAT1、KNAT2 和 KAN 蛋白的相互作用参与叶片的起始过程^[28],和 LOB 蛋白家族中的其它成员相互作用,参与叶片的极性建立过程,参与 TCP14、TCP15、AFO 和 HDA6 等共同调控叶片及其它器官的发育过程^[29-31]。后续本研究团队将以 CsAS1 和 CsAS2 蛋白为中心,通过蛋白互作网络的研究,解析茶树叶片等重要组织器官的发育过程,探究 CsAS1 和 CsAS2 蛋白在茶树生命周期不同发育阶段的详细功能。

4 结论

本论文从“福鼎大白茶”茶树茎和根中鉴定和克隆获得茶树 CsAS1 和 CsAS2 基因。生物信息学分析显示,茶树 CsAS1 和 CsAS2 蛋白具有高度的保守性; CsAS1 和 CsAS2 基因的表达在茶树不同组织和不同发育阶段存在时空特异性,且受到外源植物激素 IAA 和 GA₃ 及其它非生物逆境的影响。根据本研究结果推断 CsAS1 和 CsAS2 基因可广泛参与茶树叶片的形态建成和非生物逆境的胁迫响应过程,为深入分析茶树 CsAS1 和 CsAS2 蛋白的功能提供了一定参考。

参考文献:

- [1] ICHIHASHI Y, TSUKAYA H. Behavior of Leaf Meristems and Their Modification [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 1060.
- [2] DU C, GUAN C M, JIAO Y L. Molecular Mechanisms of Leaf Morphogenesis [J]. *Molecular Plant*, 2018, 11(9): 1117-1134.
- [3] PENG Z Y, JIAO Y L, WANG Y. Morphogenesis of Leaves: From Initiation to the Production of Diverse Shapes [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2023(3): 1-12.
- [4] LIAN H, LI X R, LIU Z Y, et al. HYL1 is Required for Establishment of Stamen Architecture with Four Microsporangia in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(11): 3397-3410.
- [5] TORIBA T, OHMORI Y, HIRANO H Y. Common and Distinct Mechanisms Underlying the Establishment of Adaxial and Abaxial Polarity in Stamen and Leaf Development [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2011, 6(3): 430-433.
- [6] WANG J J, XU J, QIAN Q, et al. Development of Rice Leaves: How Histocytes Modulate Leaf Polarity Establishment [J]. *Rice Science*, 2020, 27(6): 468-479.
- [7] FU Y L, XU L, XU B, et al. Genetic Interactions between Leaf Polarity-Controlling Genes and *ASYMMETRIC LEAVES1* and *2* in *Arabidopsis* Leaf Patterning [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2007, 48(5): 724-735.
- [8] XU L, XU Y, DONGA W, et al. Novel *As1* and *As2* Defects in Leaf Adaxial-Abaxial Polarity Reveal the Requirement for *ASYMMETRIC LEAVES1* and *2* and *ERECTA* Functions in Specifying Leaf Adaxial Identity [J]. *Development* (Cambridge, England), 2003, 130(17): 4097-4107.
- [9] PULIDO A, LAUFS P. Co-Ordination of Developmental Processes by Small RNAs during Leaf Development [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61(5): 1277-1291.
- [10] ARMENTA-MEDINA A, LEPE-SOLTERO D, XIANG D Q, et al. *Arabidopsis thaliana* miRNAs Promote Embryo Pattern Formation Beginning in the Zygote [J]. *Developmental Biology*, 2017, 431(2): 145-151.
- [11] LUONG T Q, KETA S, ASAI T, et al. A Genetic Link between Epigenetic Repressor AS1-AS2 and DNA Replication Factors in Establishment of Adaxial-Abaxial Leaf Polarity of *Arabidopsis* [J]. *Plant Biotechnology (Tokyo, Japan)*, 2018, 35(1): 39-49.
- [12] MACHIDA C, NAKAGAWA A, KOJIMA S, et al. The Complex of *ASYMMETRIC LEAVES (AS)* Proteins Plays a

- Central Role in Antagonistic Interactions of Genes for Leaf Polarity Specification in *Arabidopsis* [J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 2015, 4(6): 655-671.
- [13] VIAL-PRADEL S, KETA S, NOMOTO M, et al. *Arabidopsis* Zinc-Finger-Like Protein ASYMMETRIC LEAVES2 (AS2) and Two Nucleolar Proteins Maintain Gene Body DNA Methylation in the Leaf Polarity Gene *ETTIN* (*ARF₃*) [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2018, 59(7): 1385-1397.
- [14] ZHANG Y M, ZHANG S Z, ZHENG C C. Genomewide Analysis of LATERAL ORGAN BOUNDARIES Domain Gene Family in Zea Mays [J]. *Journal of Genetics*, 2014, 93(1): 79-91.
- [15] IWAKAWA H, TAKAHASHI H, MACHIDA Y, et al. Roles of ASYMMETRIC LEAVES2 (AS2) and Nucleolar Proteins in the Adaxial-Abaxial Polarity Specification at the Perinucleolar Region in *Arabidopsis* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(19): 7314.
- [16] MEI C, LIU Y W, FENG R Y, et al. Identification and Expression Analysis of the AS2 Gene Family under Abiotic Stress in *Solanum tuberosum* L [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2020, 26(6): 1498-1507.
- [17] MATSUMURA Y, IWAKAWA H, UENO Y, et al. The Function of ASYMMETRIC LEAVES2 in the Root [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2006, 47: S119-S119.
- [18] CHRISTENSEN S, WEIGEL D. Plant Development; The Making of a Leaf [J]. *Current Biology: CB*, 1998, 8(18): R643-R645.
- [19] SATTERLEE J W, SCANLON M J. Plant Development; How Leaves Take Shape [J]. *Current Biology: CB*, 2019, 29(16): R803-R805.
- [20] QI Y P, SUN Y, XU L, et al. *ERECTA* is Required for Protection Against Heat-Stress in the *AS1/AS2* Pathway to Regulate Adaxial-Abaxial Leaf Polarity in *Arabidopsis* [J]. *Planta*, 2004, 219(2): 270-276.
- [21] SUN Y, ZHOU Q W, ZHANG W, et al. *ASYMMETRIC LEAVES1*, an *Arabidopsis* Gene that is Involved in the Control of Cell Differentiation in Leaves [J]. *Planta*, 2002, 214(5): 694-702.
- [22] MANGEON A, LIN W C, SPRINGER P S. Functional Divergence in the *Arabidopsis* LOB-Domain Gene Family [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2012, 7(12): 1544-1547.
- [23] MATSUMURA Y, IWAKAWA H, MACHIDA Y, et al. Characterization of Genes in the ASYMMETRIC LEAVES2/LATERAL ORGAN BOUNDARIES (AS2/LOB) Family in *Arabidopsis thaliana*, and Functional and Molecular Comparisons between AS2 and other Family Members [J]. *The Plant Journal*, 2009, 58(3): 525-537.
- [24] SPRINGER P S, LIN W C, SHUAI B. The Role of LOB-Domain Genes in Leaf Development [J]. *Plant Biology (Rockville)*, 2003, 2003: 115-115.
- [25] HUANG C J, HU G J, LI F F, et al. *NbPHAN*, a MYB Transcriptional Factor, Regulates Leaf Development and Affects Drought Tolerance in *Nicotiana benthamiana* [J]. *Physiologia Plantarum*, 2013, 149(3): 297-309.
- [26] YANG J Y, IWASAKI M, MACHIDA C, et al. betaC1, the Pathogenicity Factor of TYLCCNV, Interacts with AS1 to Alter Leaf Development and Suppress Selective Jasmonic Acid Responses [J]. *Genes & Development*, 2008, 22(18): 2564-2577.
- [27] TARAMINO G, SAUER M, STAUFFER J L Jr, et al. The Maize (*Zea mays* L.) *RTCS* Gene Encodes a LOB Domain Protein that is a Key Regulator of Embryonic Seminal and Post-Embryonic Shoot-Borne Root Initiation [J]. *The Plant Journal*, 2007, 50(4): 649-659.
- [28] LI Z F, LI B, LIU J, et al. Transcription Factors AS1 and AS2 Interact with LHP1 to Repress *KNOX* Genes in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2016, 58(12): 959-970.
- [29] LUO M, YU C W, CHEN F F, et al. Histone Deacetylase HDA6 is Functionally Associated with AS1 in Repression of *KNOX* Genes in *Arabidopsis* [J]. *PLoS Genetics*, 2012, 8(12): e1003114.
- [30] HUNG F Y, FENG Y R, HSIN K T, et al. *Arabidopsis* Histone H3 Lysine 9 Methyltransferases KYP/SUVH5/6 are Involved in Leaf Development by Interacting with AS1-AS2 to Repress *KNAT1* and *KNAT2* [J]. *Communications Biology*, 2023, 6: 219.
- [31] GONZÁLEZ-REIG S, RIPOLL J J, VERA A, et al. Antagonistic Gene Activities Determine the Formation of Pattern Elements along the Mediolateral Axis of the *Arabidopsis* Fruit [J]. *PLoS Genetics*, 2012, 8(11): e1003020.