

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2023.07.007

袁连玉, 韩雨欣, 代洪苇, 等. 茶树 *CsGID1s* 基因家族的克隆及功能分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2023, 45(7): 75-86.

茶树 *CsGID1s* 基因家族的克隆及功能分析

袁连玉, 韩雨欣, 代洪苇, 郑姝婷, 童华荣

西南大学 食品科学学院, 重庆 400715

摘要: 赤霉素(GA)是重要的植物激素, 广泛参与植物生长发育和逆境响应过程. *GID1s* 蛋白是 GA 受体, 在 GA 信号转导途径中发挥着重要的调控作用. 研究克隆获得了 3 个‘福鼎大白’茶树的 GA 受体蛋白家族基因: *CsGID1A*, *CsGID1B* 和 *CsGID1C*, 分别编码蛋白长度为 346 aa, 430 aa, 340 aa, 理论等电点分别为 8.31, 5.97 和 5.63, 均定位于细胞核. 系统进化树和保守结构域分析表明: 3 个茶树 GA 受体蛋白间氨基酸序列高度保守, 且与葡萄 *GID1s* 亲缘最近; 3 个 *CsGID1s* 蛋白的二级和空间结构为羧酸酯酶蛋白家族的典型结构. 转录组数据分析显示: 在茶树不同组织部位中, *CsGID1C* 基因的表达量均较高, 且 *CsGID1s* 基因在叶片和花发育初期的表达量低于嫩叶和半开花组织. *CsGID1A* 和 *CsGID1B* 基因在幼嫩组织中的表达量低于成熟组织. 外源赤霉素 GA3 胁迫处理结果显示: 75 $\mu\text{mol/L}$ GA3 处理 24 h 后, *CsGID1s* 基因的表达受到抑制; 100 $\mu\text{mol/L}$ GA3 处理 48 h 后, *CsGID1s* 基因的表达被诱导上调. 启动子元件分析结果也显示: *CsGID1s* 家族基因启动子中均含有多个 GA 及其他非生物逆境胁迫响应的元件. 综上所述: *CsGID1s* 基因参与茶树赤霉素 GA 信号调控及其他非生物逆境的胁迫响应过程, 可为 GA 信号转导及其在茶树生长发育过程中的功能研究提供理论参考.

关键词: 茶树; *CsGID1s* 基因; 生物信息学; 基因克隆

中图分类号: S567; R282

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2023)07-0075-12

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Cloning and functional analysis of *CsGID1s* gene family in Tea Plant

YUAN Lianyu, HAN Yuxin, DAI Hongwei,
ZHENG Shuting, TONG Huarong

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

Abstract: Gibberellin (GA), an important plant hormones, exists widely in plants and involves in the regulation of biological processes and environmental adaptation in plants. As GA receptors, *GID1s* proteins play important roles in GA signal transduction pathway. In this study, three GA receptor protein genes,

收稿日期: 2021-08-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(31400583); 重庆市技术创新与应用发展专项(CSTB2022TIAD-CUX00211).

作者简介: 袁连玉, 副教授, 主要从事茶树种质资源鉴定及创新研究.

通信作者: 童华荣, 教授.

CsGID1A, *CsGID1B* and *CsGID1C* were identified and cloned from ‘Fudingdabai’ tea plant. Their nucleotide length was 346 aa, 430 aa and 340 aa, respectively. The theoretical isoelectric points of *CsGID1s* were 8.31, 5.97 and 5.63, respectively. They were all located in the nucleus. Phylogenetic and conserved domain analysis showed that *CsGID1s* proteins in tea plant were highly conserved with the homologous protein family in other plants, among which the closest relationship is with grapes. The three *CsGID1s* proteins had similar spatial and typical structure of carboxylesterase family in α/β folding hydrolase superfamily. The results of transcriptome analysis showed that the expression of *CsGID1C* gene was high in different tissues and parts of tea tree, while the expression of *CsGID1A* and *CsGID1B* genes was low in young tissues and high in mature tissues. The tissue-specific expression analysis showed that the expression level of *CsGID1s* gene in leaves and flowers of tea plants was low at the early stage of development, and the expression level of *CsGID1s* gene was the highest in young leaves and semi-flowering tissues. The expression of *CsGID1s* was down regulated by 75 $\mu\text{mol/L}$ GA3 treatment for 24 h, and was significantly up-regulated after 100 $\mu\text{mol/L}$ GA3 treatment for 48 h. The results of promoter analysis showed that the promoter of *CsGID1s* gene family contained many GA and other abiotic stress responsive elements. In conclusion, *CsGID1s* genes could be widely involved in GA signaling pathway and other abiotic stress responses in tea plants, which provides reference for GA signal transduction pathway and its function in tea growth and development.

Key words: tea plant; *CsGID1s* gene; bioinformatics methods; gene clone

赤霉素(GA)是一类重要的植物激素,对植物芽叶的生长和茎的伸长有重要的促进作用,植物可通过赤霉素合成和赤霉素细胞信号转导途径调控植物的生长发育过程^[1-2].茶树是重要的叶用经济作物,研究茶树 GA 信号转导及调控途径,对解释茶树的形态建成过程,尤其是叶片的发育非常重要. GID1s(Gibberellin insensitive dwarf1)为 GA 受体蛋白,是一种可溶性蛋白,其基因家族成员已在多种植物中被克隆研究,如水稻^[3]、葡萄^[4]、李^[5]、柑橘^[6]和百子莲^[7]等,且均定位于细胞核. GID1s 受体蛋白能够识别活性 GA 并与其结合,使其构象发生改变,从而提高其与转录抑制因子 DELLA 蛋白的相互作用,加速 DELLA 的泛素化通路^[1,7],最终形成 GA-GID1-DELLA 三聚体,使得 DELLA 蛋白的抑制作用减弱,导致 DELLA 蛋白被降解,激活了植物对 GA 的反应^[3,8-9]. *GID1s* 基因的表达会影响植物的株高及开花过程,水稻过表达 *OsGID1* 基因表现出 GA 敏感表型,株高增加^[3].在杨树和拟南芥中过表达 *PtGID1* 基因也可以促使其花期提前,株高增加^[10].拟南芥中已被鉴定出 3 个具有 GA 受体功能的 *GID1s* 基因,分别命名为 *AtGID1A*, *AtGID1B* 与 *AtGID1C*,他们在水解途径中都具有特殊的功能^[11].在蛋白水解 GA 信号途径中, *AtGID1A* 在茎的伸长和繁殖力中起到主要的作用, *AtGID1C* 在茎的伸长中起到次要作用, *AtGID1B* 在繁殖力中起到次要作用^[12].在非蛋白水解途径中, *AtGID1A* 在发芽和茎的伸长中起到主要作用,在繁殖力中起到次要作用; *AtGID1B* 在茎的伸长中起到次要作用,在繁殖力中起到最主要的作用^[13].此外,龙眼 GID1 蛋白在种子萌发和花苞发育过程中具有重要作用^[14];在水稻中超表达 *GID1a* 基因能使叶子保持较长时间的绿色,从而增加植株生物量^[2];在紫花苜蓿中 *GID1b* 基因主要作用于根和花的发育过程^[15].

茶树作为我国重要的经济作物,其生物学形态建成对茶叶的产量和质量等有着十分重要的影响,了解 GA 在茶树中的信号转导途径有利于提升茶树的经济价值.前人研究较少涉及茶树 GID1 受体对 GA 信号转导途径的作用,而茶树基因组数据的公布使得 *CsGID1s* 基因家族的全基因组鉴定及功能分析成为可能.本研究在茶树全基因组范围内鉴定和克隆了 3 个 *CsGID1s* 基因家族成员,分别命名为 *CsGID1A*, *CsGID1B* 和 *CsGID1C*,利用全面的生物信息学方法分析了该家族成员的特征特性,分析验证 *CsGID1s* 基因在茶树不同品种、不同组织及不同非生物逆境胁迫和不同浓度的外源 GA3 处理下的表达特征,为茶树 *CsGID1s* 基因的功能及茶树中 GA 信号传导途径研究提供参考.

1 材料与方法

1.1 材料

以 10 年生茶树‘福鼎大白’为材料进行茶树 GA 受体蛋白的克隆及花和叶不同发育时期的表达分析等试验, 材料茶树种植于西南大学茶树种质资源圃内, 分别取‘福鼎大白’茶树的老叶、芽等不同组织材料 1 g, 液氮速冻后, 存储于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中备用。

试验试剂: 多糖多酚植物 RNA 提取试剂盒, 北京艾德莱生物科技有限公司; 一步法反转录预混液, 北京全式金生物技术股份有限公司; Taq DNA 聚合酶, pMD18-T, DH5 α 大肠杆菌感受态细胞和 DNA 切胶回收试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 荧光定量 PCR 试剂超混液, 美国伯乐生物技术有限公司; 引物合成和基因测序, 英潍捷基(上海)贸易有限公司。

1.2 茶树 GA 受体蛋白家族成员的克隆

以‘福鼎大白’茶树的老叶及芽头为材料, 参照 RNA 提取试剂盒说明书的步骤, 提取总 RNA; 经过琼脂糖凝胶及分光光度计法检验合格后, 按照一步法反转录试剂盒说明书进行 RNA 的反转录, 合成用于基因克隆及表达分析的 cDNA 模板。克隆茶树 GA 受体蛋白基因, 所用引物序列见表 1。PCR 扩增程序: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 s; $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 s; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 min; 34 个循环后, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5min, 琼脂糖电泳, 切胶回收, 连接 pMD18-T 载体测序, 并与 TPIA 数据库中公布的序列进行比对, 确定克隆序列的准确性。

1.3 茶树 GA 受体蛋白家族的生物信息学分析

分别从拟南芥数据库 TAIR 和 JGI-Phytozome 12 中下载拟南芥、水稻、葡萄、杨树和紫苏柳等植物 *GID1s* 基因的核苷酸和蛋白质序列, 并利用本地 Blast 方法在茶树基因组数据库 TPIA 中鉴定并下载茶树 *CsGID1s* 基因的预测序列及其相关数据。利用软件对 *CsGID1s* 蛋白的分子量、等电点进行分析, 利用软件 SOPM 和 SWISS-MODEL 分析 *CsGID1s* 蛋白的结构模型, 运用软件 ClustalX1.8, MEGA4.0 和 DNAMAN 进行茶树 *CsGID1s* 蛋白的氨基酸序列比对。采用邻接法(Neighbor-joining)构建进化树, Bootstrap 参数 1 000, 其余参数设置为默认值; 通过在线软件 MEME 分析茶树 *CsGID1s* 蛋白的保守基序, 并将最大数值设为 20。利用 Plant-mPLoc 进行 *CsGID1s* 蛋白的亚细胞定位分析; 利用软件 Plantcare 分析预测从茶树基因组数据库 TPIA 中下载的 *CsGID1s* 基因上游 1.5 kb 启动子序列中含有的顺式作用元件。本研究还利用模式植物拟南芥 *AtGID1s* 蛋白家族在蛋白质相互作用网络数据库 STRING 中的相互关系网络, 分析与茶树 *CsGID1s* 相关联的蛋白。

1.4 茶树 GA 受体蛋白基因的表达分析

从 TPIA 数据库中下载了 *CsGID1s* 在‘舒茶早’茶树 8 个组织部位(根、茎、芽头、花、果、嫩叶、成熟叶和老叶)及其叶片中 *CsGID1s* 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 检测 *CsGID1s* 基因在茶树 8 个组织部位中的表达量; 为了解 *CsGID1s* 基因在茶树中的功能, 本研究对‘福鼎大白’茶树 2 年生扦插苗进行外源 GA3 胁迫处理, 分析 *CsGID1s* 基因的表达特异性。外源 GA3 处理流程: 在 3 个蓝色方形塑料盆中, 分别加入 MS 液体培养基(对照), MS 液体培养基+75 $\mu\text{mol/L}$ GA, MS 液体培养基+100 $\mu\text{mol/L}$ GA, 对‘福鼎大白’茶树的扦插苗进行水培及 GA 处理, 分别在人工气候箱(16 h 白/8 h 黑, 光照强度 15 000 Lx, 温度 $23\text{ }^{\circ}\text{C}$, 湿度 75%)中培养 24 h 和 48 h 后, 对茶苗成熟度一致的第 2 叶进行取样, 液氮速冻后, 放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。采用多糖多酚 RNA 提取试剂盒方法提取样本的总 RNA, 并反转录成 cDNA 模板, 用于 *CsGID1s* 基因的表达特异性分析。用 Primer3 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(*Actin*)。10 μL Real-Time PCR 反应体系: SYBR Premix 5 μL , 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的上下游引物各 0.2 μL , cDNA 0.5 μL , 灭菌超纯水 ddH $_2$ O 4.1 μL , 充分混匀, 于 Bio-Rad CFX96 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, 用 Sigma plot 软件分析差异显著性并制图。

表 1 荧光定量 PCR 引物信息表

引物名称	引物序列	用途
<i>CsGID1A</i>	5'-ATGGCCGCTAGGAATGAAATC-3'和 5'-TCAACGATTAGAATGGATGAA-3'	基因克隆
<i>CsGID1B</i>	5'-ATGGCTGGAAGTAATGAAGTT-3 和 5'-TACTCAAGTTCCAAAAACCG-3'	
<i>CsGID1C</i>	5'-ATGGCGGGTAGTAATGAAGTC-3 和 5'-TTAAGAATTAACAAAATCACT-3'	
<i>CsGID1A-1</i>	5'-GAATCTCAATTTGGCGTCGT-3'和 5'-CGGCAGAAGGTGTCGTAGAT-3'	荧光定量 PCR
<i>CsGID1B-2</i>	5'-GGAAGCTTTGTGCACTCCTC-3'和 5'-GTTTTCAAGGTGCTCGTCGAT-3'	
<i>CsGID1C-3</i>	5'-TTCTTCCTCCCCTTCTCCAT-3'和 5'-CCCAGCCTTGAACCTCATTA-3'	
<i>CsActin-4</i>	5'-CCAGAAAGATGCTTATGTAG-3'和 5'-AGATCTTTTCCATGTCATCC-3'	

2 结果与分析

2.1 茶树 GA 受体蛋白基因家族的鉴定

为研究茶树中 GA 受体蛋白的功能,本研究利用模式植物中 GA 受体蛋白的序列信息,在茶树基因组数据中进行本地 Blast 搜索鉴定,共获得 3 个同源的茶树 GA 受体蛋白基因,分别命名为 *CsGID1A*, *CsGID1B* 和 *CsGID1C*. 本研究以‘福鼎大白’茶树的老叶提取 RNA,进行反转录后得到的 cDNA 为模板,克隆获得了 2 个茶树中的 GA 受体蛋白基因: *CsGID1A* 和 *CsGID1B*,长度分别为 1 041 bp 和 1 293 bp;以‘福鼎大白’茶树的芽头为材料,通过 RT-PCR 的方法,克隆获得 1 个茶树中的 GA 受体蛋白基因: *CsGID1C*,长度为 1 023 bp(图 1). 生物信息学方法分析 3 个基因的核苷酸和氨基酸序列,结果表明其分别编码 346 aa, 430 aa, 340 aa 长度的氨基酸残基,分子量分别为 39.42, 48.42 和 38.53 kDa;蛋白的等电点分别为 8.31, 5.97 和 5.63;亚细胞定位预测分析显示,3 个 GA 受体蛋白均定位于细胞核,这与模式植物中的 GA 受体蛋白的亚细胞定位信息一致(表 2). 染色体定位分析结果显示,3 个 *CsGID1s* 基因分别定位于茶树(‘舒茶早’)的 2 号,6 号和 7 号染色体(图 2).

表 2 茶树基因组中的 GA 受体蛋白家族成员及其理化性质

基因名称	基因编号	基因位置	编码区 长度/bp	氨基酸 数目/aa	等电点	分子量/ kDa	亚细胞 定位
<i>CsGID1A</i>	TEA031063	Scaffold1571: 353494-356380+	1 041	346	8.31	39.42	细胞核
<i>CsGID1B</i>	TEA029733	Scaffold1424: 646077-648240-	1 293	430	5.97	48.42	细胞核
<i>CsGID1C</i>	JX235369.1	Scaffold2039: 697865-704347+	1 023	340	5.63	38.53	细胞核

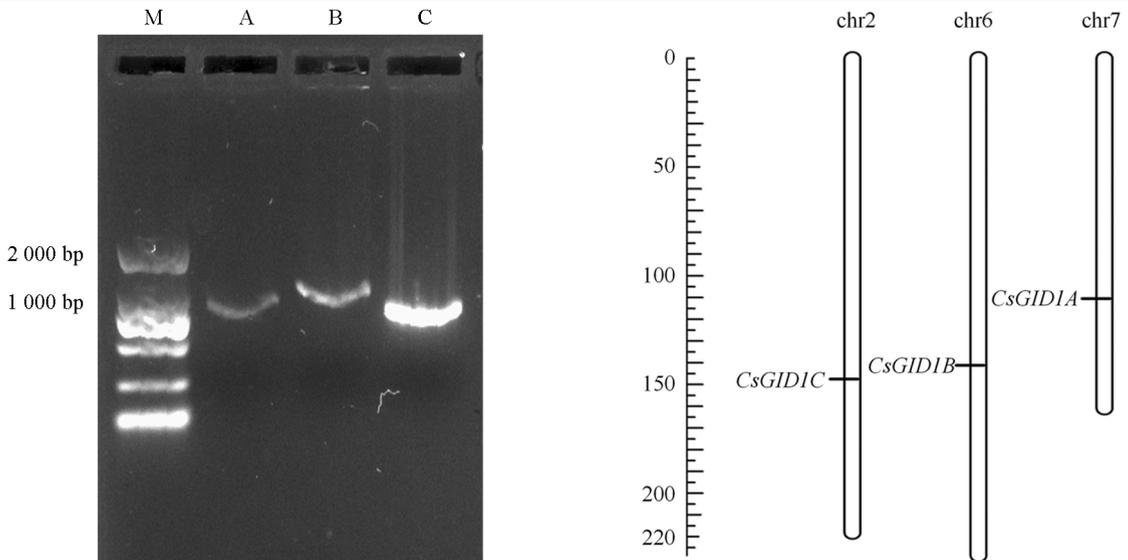
M 为分子标记, A 为 *CsGID1A*, B 为 *CsGID1B*, C 为 *CsGID1C*.

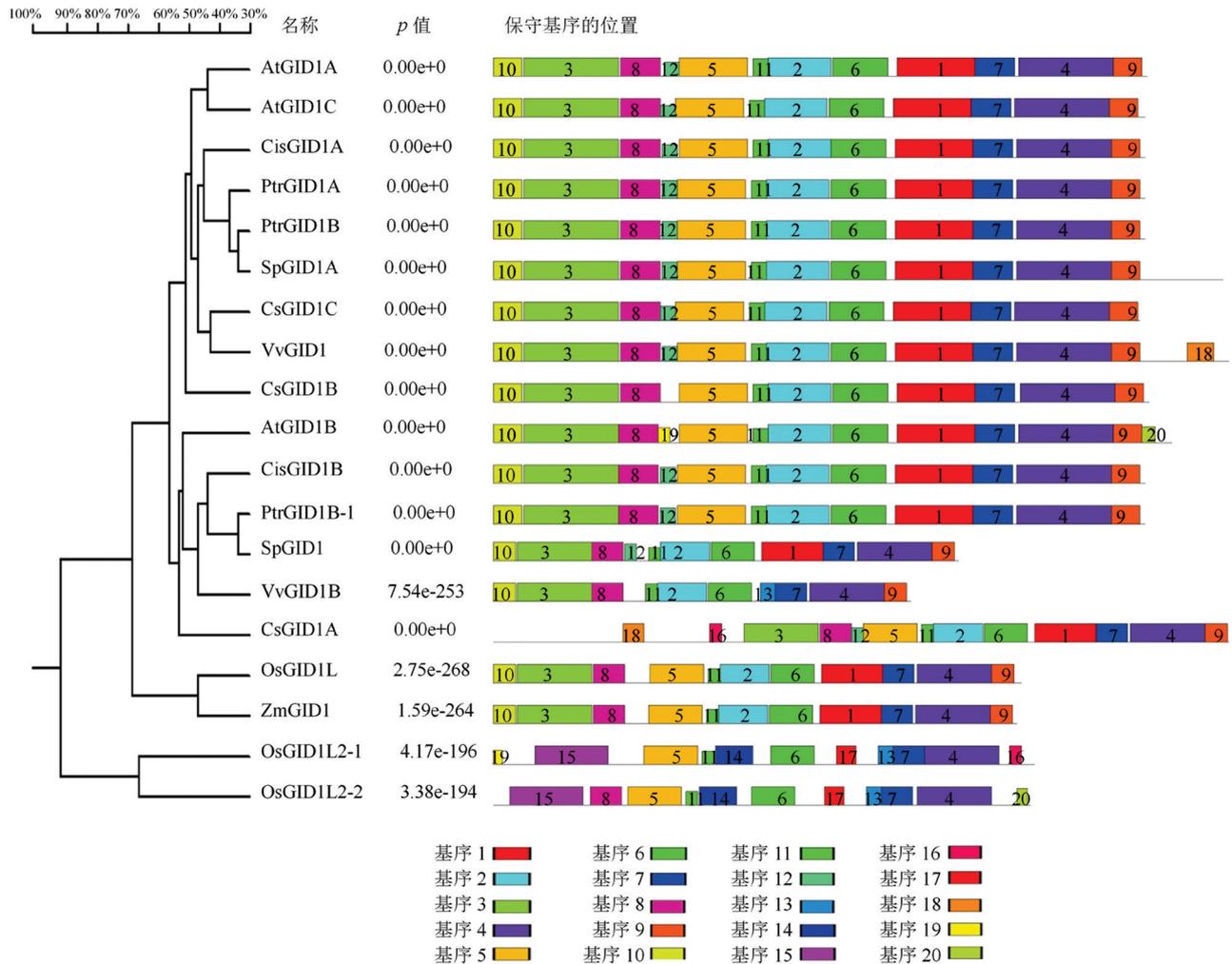
图 1 茶树 GA 受体基因的 RT-PCR 扩增

图 2 茶树 *CsGID1s* 基因的染色体定位

2.2 茶树 GA 受体蛋白系统发育及蛋白保守结构域组成

系统进化树分析结果显示,茶树中的 3 个 GA 受体蛋白与其他植物中的该蛋白氨基酸序列具有高度的保守性,其中茶树中的 *CsGID1s* 蛋白与葡萄的 *VvGID1s* 蛋白的亲缘关系最近(图 3). 保守结构域分析结果还显

示, GID1s 蛋白家族成员在不同植物中具有高度的保守性, 不同植物 GID1s 蛋白序列中含有保守基序的种类和数量基本一致, 只存在极少数保守序列差异. 茶树中的 3 个 GA 受体蛋白也是一样, 除了 CsGID1A 蛋白的 N 端有一段不含保守基序的序列外, 其余均与其他植物中已知的 GID1s 蛋白一致, 具有极其相似的保守基序. 为了进一步分析这些保守基序的特征, 本研究将多种植物中 GID1s 蛋白进行了多序列比对(图 4), 结果发现茶树中的 3 个 GID1s 蛋白具有 GA 受体蛋白所具有的几乎所有保守结构域, 如 GID1 类蛋白含有 TWVLIS, LDR, FFHGGSF, HS, IYD, YRR, DGW, GDSSGGNI, GNI, MF, LDGKYF, WYW 和 GFY 这 13 个功能结构域^[8]; 也包括 GID1 和 HSL 家族的保守域 HGG 和 GXSXG, 以及 HSL 家族中催化 3 联体氨基 Ser(S), Asp(D)和 His(H), 但 CsGID1B 氨基酸序列中 H 发生突变, 被 V 取代, 导致 HSL 蛋白失去生物催化活性^[8-9]. 与其他 GID1 一样, CsGID1A 和 CsGID1C 氨基酸序列中 H 被 I 取代. 以上结果均证明, 本研究中克隆获得的 3 个 CsGID1s 蛋白均为典型的 GA 受体蛋白, 可能具有类似的功能.

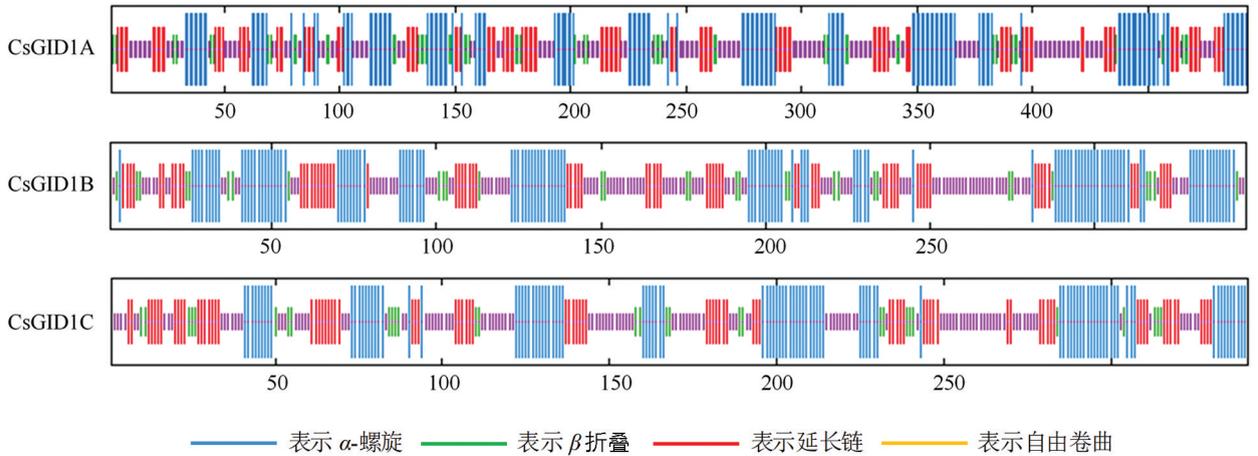
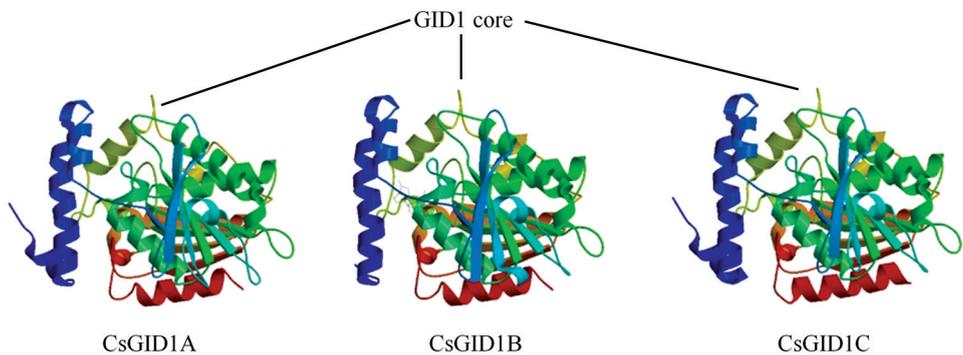


不同颜色的方块和数字代表不同的保守基序: AtGID1s 为拟南芥 GID1s 蛋白, OsGID1s 为水稻 GID1s 蛋白, VvGID1s 为葡萄 GID1s 蛋白, PtrGID1s 为杨树 GID1s 蛋白, CsGID1s 为茶树 GID1s 蛋白, SpGID1s 为紫苏柳 GID1s 蛋白.

图 3 植物中 GID1s 蛋白家族的保守基序分析

2.3 茶树 CsGID1s 蛋白的二、三级结构分析

本研究还对茶树 CsGID1s 蛋白的空间结构特点及功能进行了分析(图 5), 结果发现 3 个 CsGID1s 蛋白中, 自由卷曲所占的比例均最大, 分别为 34.89%(CsGID1A), 35.26%(CsGID1B), 37.24%(CsGID1C); 其次是 α -螺旋, 分别为 30.83%(CsGID1A), 34.97%(CsGID1B)和 29.33%(CsGID1C); 延长链和 β 折叠所占的比例也较大. 以已知 GA 受体蛋白 2zsh.1 为模板, 用 SWISS-MODEL 在线软件分析蛋白的三级结构(图 6), 结果显示 CsGID1A, CsGID1B 和 CsGID1C 3 个蛋白的空间结构非常相似, 均具有由 8 个 β 折叠片层和 7 个 α 螺旋组成的 GID1 蛋白核心结构, 都属于 α/β 折叠水解酶超家族中的羧酸酯酶家族的典型三级结构, 由此可推测 CsGID1s 蛋白家族具有相同的生物学功能.

图 5 茶树 *CsGID1s* 蛋白二级结构的预测分析图 6 茶树 *CsGID1s* 蛋白的 3D 空间结构

2.4 茶树 *CsGID1s* 基因的时空表达特异性分析

为明确 *CsGID1s* 蛋白在茶树生长发育中的调控功能, 本研究分析了转录组数据库中 *CsGID1s* 基因在 17 种山茶属植物叶片和茶树不同组织部位的表达特异性. 图 7a 中, *CsGID1A* 基因在云抗 10 号(CSA)、秃房茶(TF)、厚叶红山茶(HZ)和大理茶(CTA)等的叶片中表达量较低; *CsGID1B* 和 *CsGID1C* 基因无明显种属间的表达差异, 且其中表达量由大到小依次为 *CsGID1C*, *CsGID1B*, *CsGID1A*. 图 7b 中, 在茶树的组织部位, *CsGID1C* 基因的表达量均较高; *CsGID1A* 和 *CsGID1B* 基因在芽、嫩叶和花中的表达量较低, 在根、茎、成熟叶和老叶中的表达量较高, 在茶果中的表达量最高. 以上结果表明, 3 个 *CsGID1s* 基因可能在茶树的组织部位中发挥的功能存在差异.

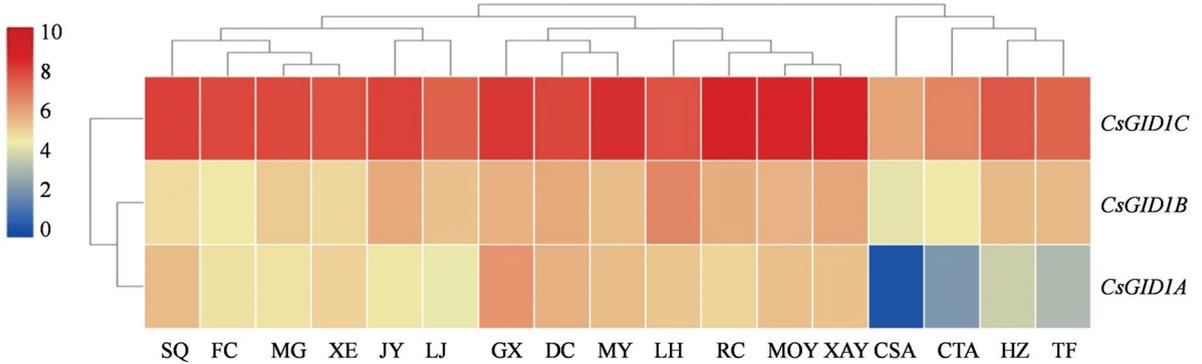
2.5 茶树 *CsGID1s* 基因响应非生物逆境胁迫的表达特异性分析

为了进一步明确 *CsGID1s* 基因的功能, 本研究从 TPIA 数据库中获得了 *CsGID1s* 基因响应 NaCl、干旱、MeJA 和冷等不同非生物逆境胁迫的转录组数据, 并分析了其表达特异性(图 8). 在 NaCl 和干旱胁迫条件下, *CsGID1A* 基因的表达是升高的, *CsGID1B* 和 *CsGID1C* 基因的表达是被抑制的. 在冷胁迫条件下, *CsGID1A* 基因的表达受到抑制, *CsGID1B* 基因的表达受到诱导, *CsGID1C* 基因的表达无明显变化. 在外源 JA 激素的胁迫下, *CsGID1B* 基因的表达在 24 h 时略有升高, 48 h 后又恢复正常; *CsGID1A* 和 *CsGID1C* 基因的表达基本不受影响, 变化不明显. 由以上结果可以推测, 茶树 *CsGID1s* 基因可能参与了茶树应对盐、干旱和冷等非生物逆境胁迫的响应过程, 但对外源 JA 激素的响应较小.

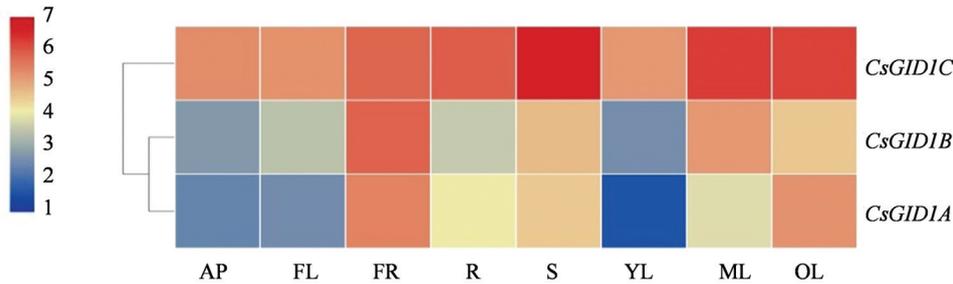
2.6 *CsGID1s* 启动子片段顺式作用元件分析

为进一步分析 *CsGID1s* 基因的功能, 本研究分别下载该基因家族成员的启动子序列, 并运用在线软件 Plantcare 进行分析. *CsGID1s* 基因启动子中含有多个顺反子元件(表 3), 其中 CAAT-box 和 TATA -box 常规

关键顺反子元件的数量较多. 在 *CsGID1B* 和 *CsGID1C* 基因启动子中分别含有 1 个能够参与赤霉素 GA 响应的 TATC-box 和 P-box 顺反子元件. 在该家族基因的启动子序列中含有较多的光响应元件, 如 chs-CMA2a, Box 4, AT1-motif, GATA-motif, GA-motif 和 GT1-motif. 另外, 在 *CsGID1s* 基因启动子序列中还含有响应干旱、冷和厌氧等外界非生物逆境及外界外源激素诱导的元件. 由以上结果可以推测, *CsGID1s* 基因家族成员可能参与了赤霉素的代谢过程, 并且可能广泛参与茶树对外界非生物逆境的响应过程.



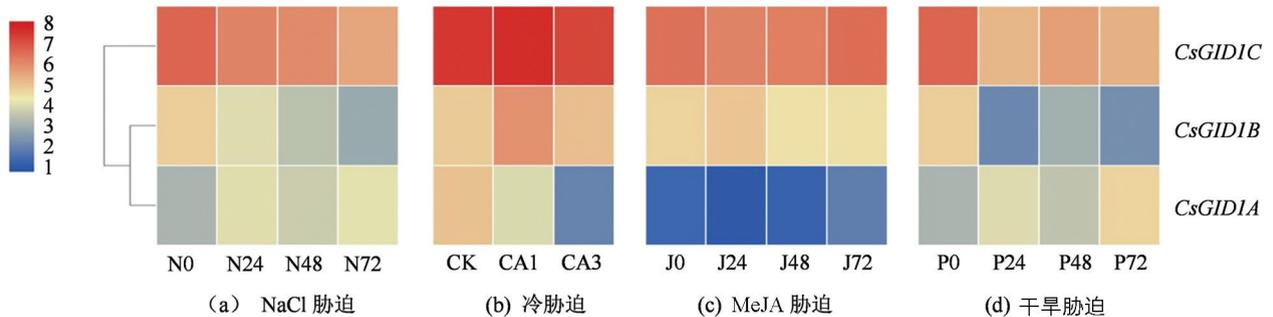
(a) *CsGID1s* 基因在 16 种茶树及其近源种植物中的表达量



(b) *CsGID1s* 基因在不同组织部位中的表达量

a 图为不同的茶种植物, SQ 为 *Ser. Quinquelocularis* Chang, FC 为 *C. fengchengensis*, MG 为 *C. makuanica*, XE 为 *C. parvisepala*, JY 为 *C. jingyunshanica*, LJ 为 *C. sinensis* cv. Longjing43, GX 为 *C. kwangsiensis*, DC 为 *C. tachangensis*, MY 为 *C. ptiliphylla*, LH 为 *C. atrothea*, RC 为 *C. pubescens*, MOY 为 *C. leptophylla*, XAY 为 *C. angustifolia*, CSA 为 *C. assamica* cv. Yunkang 10, CTA 为 *C. taliensis*, HZ 为 *C. crassicolumna*, TF 为 *C. gymnogyne*. b 图中不同组织部位的材料取自‘舒茶早’茶树, AP 为茶芽, FL 为茶花, FR 为茶果, R 为根, S 为茎, YL 为嫩叶, ML 为成熟叶, OL 为老叶. 基因表达量用 TPM 来度量, 数据下载于茶树基因组数据库网站 TP1A; 蓝色代表低表达, 红色代表高表达.

图 7 茶树 *CsGID1s* 基因在不同茶树及其近源种植物 and 不同组织部位中的表达量分析



蓝色代表低表达, 红色代表高表达. a 图中 N0, N24, N48 和 N72 为 200 mol/L NaCl 处理 0 h, 24 h, 48 h, 72 h; b 图中 CK 为未冷驯化处理对照, CA1 和 CA3 分别为完全驯化和去驯化; c 图中 J0, J24, J48 和 J72 分别为 MeJA 处理 0 h, 24 h, 48 h 和 72 h; d 图中 P0, P24, P48 和 P72 分别为 25% PEG 处理 0 h, 24 h, 48 h 和 72 h.

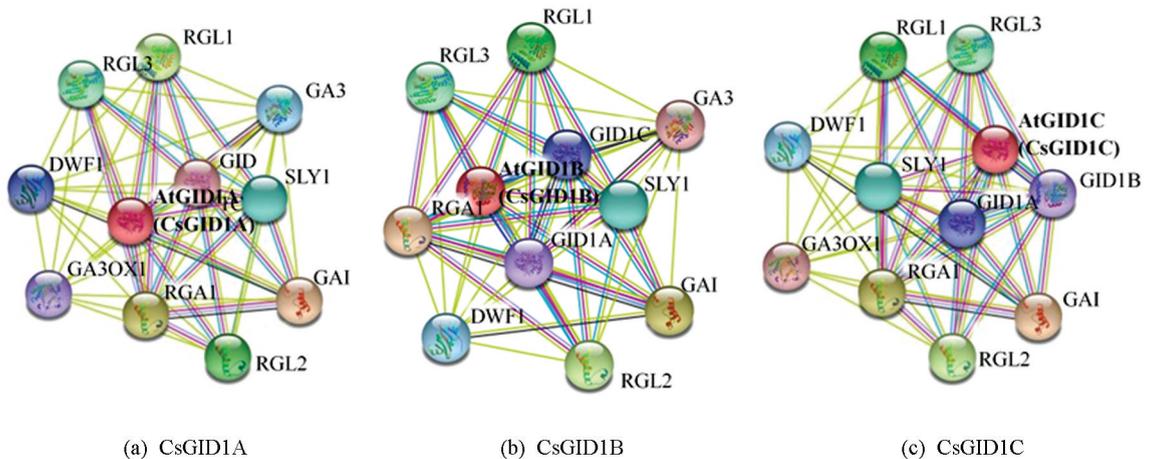
图 8 茶树 GA 受体蛋白基因在不同逆境胁迫下的表达分析

表 3 *CsGID1s* 启动子顺式作用元件预测

顺式作用元件	元件数量			功能
	<i>CsGID1A</i>	<i>CsGID1B</i>	<i>CsGID1C</i>	
CAAT-box	36	39	38	启动子和增强子区域中常见顺式作用元件
TATA-box	63	36	76	转录起点-30 左右的核心启动子元件
TATC-box		1		参与赤霉素反应的顺式作用元件
P-box			1	赤霉素响应元件
chs-CMA2a		1		光响应元件的一部分
Box 4	5		3	
AT1-motif	1			
GATA-motif	2			
GA-motif	1		1	
GT1-motif	1	6		
LTR			1	参与低温响应的顺式作用元件
MBS		1	2	参与干旱诱导的 MYB 结合位点
TC-rich repeats		4		参与防御和应激反应的顺式作用元件
ARE		1	5	厌氧诱导必需的顺式作用调节元件
ABRE			2	参与脱落酸反应的顺式作用元件
TGA-element	1	1		生长素响应元件
TCT-motif			1	参与 MeJA 反应的顺式作用元件
CGTCA-motif			2	
TGACG-motif			2	

2.7 茶树 *CsGID1s* 蛋白的相互作用网络分析

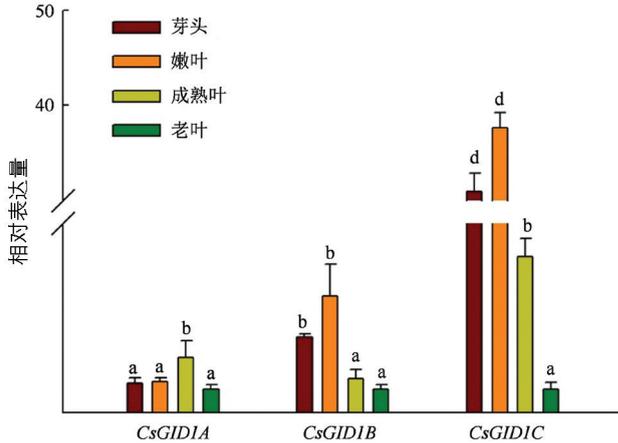
本研究还利用拟南芥同源的 *AtGID1s* 蛋白进行了 *CsGID1s* 蛋白相互作用关系网络的预测分析。图 9 显示, 茶树 *CsGID1s* 蛋白间均存在相互作用关系, 而与其存在相互作用关系的蛋白均与赤霉素 GA 的合成、结合及其运输等代谢过程有关, 其中包含 DELLA 蛋白 (RGA1, RGL1, RGL2, RGL3 及 GAI 等), GA3, SLY1 及 GA3OX1 等。由此可推测, *CsGID1s* 蛋白可与 GA 吸收、转运、代谢相关的蛋白相互作用, 共同调控茶树对赤霉素 GA 的代谢过程。

图 9 依据拟南芥同源蛋白推测茶树 *CsGID1s* 相互作用的蛋白网络

2.8 茶树 *CsGID1s* 基因表达特异性分析

为了进一步分析茶树 *CsGID1s* 基因的功能, 本研究还利用荧光定量 PCR 分析了该基因家族在茶树叶

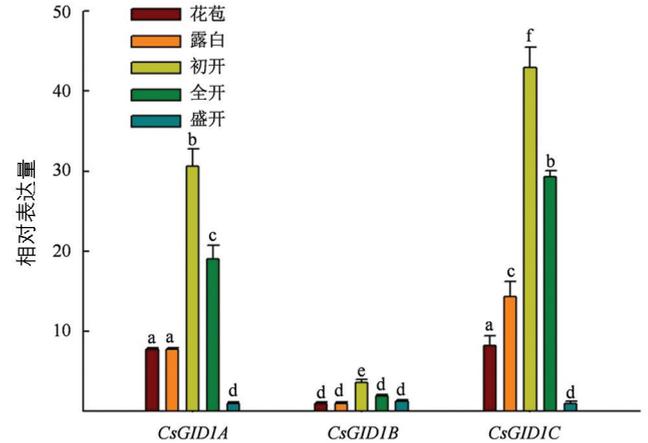
片和花中不同发育阶段的表达特异性. 图 10 显示, *CsGID1C* 基因在叶片不同发育时期的表达量均高于 *CsGID1A* 和 *CsGID1B* 基因. 在叶片由芽头→嫩叶→成熟叶→老叶的发育过程中, *CsGID1s* 基因的表达先升高再降低, 在芽头、成熟叶和老叶中的表达量要低于嫩叶(*CsGID1A* 除外). 该部分基因的表达规律与图 7 数据库中的转录组数据不一致, 可能是因为材料属于不同品种和采样时对叶片成熟度的定义有关. 图 11 中, *CsGID1B* 基因在花不同发育时期的表达量均远低于 *CsGID1A* 和 *CsGID1C* 基因; 在花由花苞→露白→初开→全开→盛开的发育过程中, *CsGID1s* 基因的表达也是先升高再降低, 在花的初开和全开时期的表达量要远高于其他时期. 由以上结果可知, *CsGID1s* 基因的表达存在时空特异性.



小写字母不同表示 $p < 0.05$, 差异有统计学意义.

图 10 *CsGID1s* 基因在

茶树叶片不同发育时期的表达分析



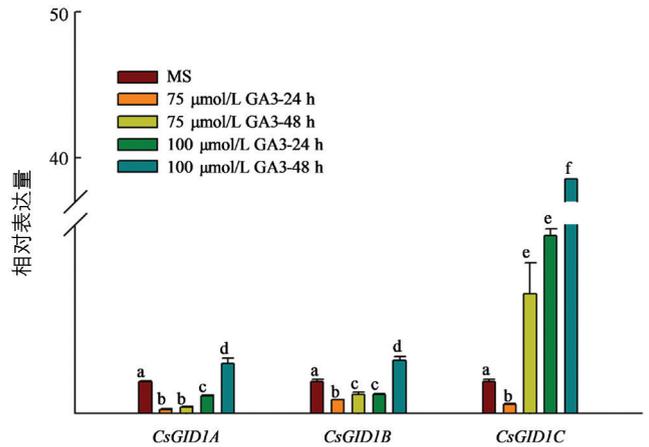
小写字母不同表示 $p < 0.05$, 差异有统计学意义.

图 11 *CsGID1s* 基因在

茶树花不同发育时期的表达分析

2.9 茶树 *CsGID1s* 基因响应外源赤霉素 GA3 的表达特异性分析

为了解 *CsGID1s* 基因的功能, 本研究对 2 年生‘福鼎大白’茶苗进行了外源 GA3 的胁迫处理, 并分析了胁迫处理后的 *CsGID1s* 基因的表达情况(图 12). 与对照 MS 培养的茶苗为对照, 在 75 $\mu\text{mol/L}$ GA3 处理 24 h 后, *CsGID1A*, *CsGID1B* 和 *CsGID1C* 基因的表达均受到抑制, 表达量下降; 在 75 $\mu\text{mol/L}$ GA3 处理 48 h 后, *CsGID1A* 和 *CsGID1B* 基因的表达继续受到抑制, 表达量较低, 而 *CsGID1C* 基因的表达受到诱导, 表达量被上调. 在 100 $\mu\text{mol/L}$ GA3 处理 24 h 后, *CsGID1A*, *CsGID1B* 基因的表达量下降, 但在处理 48 h 后, 该 2 个基因的表达会被明显上调; 在 100 $\mu\text{mol/L}$ GA3 处理 24 h, 48 h 后, *CsGID1C* 基因的表达均受到诱导, 表达量被明显上调. 以上结果推测, 茶树中 *CsGID1s* 基因的表达在不同浓度 GA3 的不同处理时间时其表达量是不一致的, 较为明显的规律为低浓度外源 GA3, 处理时间较短时, *CsGID1s* 基因的表达受到抑制; 高浓度外源 GA3, 处理时间较长时, *CsGID1s* 基因的表达会被诱导, 表达量明显被上调.



小写字母不同表示 $p < 0.05$, 差异有统计学意义.

图 12 茶树 *CsGID1s* 基因在

不同外源 GA3 处理条件下的表达分析

3 讨论

自 20 世纪 50 年代 GA 被列入植物激素以来, 人们对其在植物中调控植物生长发育及代谢途径的机理方面进行了很多研究, *GID1s* 蛋白作为 GA 受体, 也被广泛探讨. 2005 年, *GID1s* 基因最早在水稻中被分离出来^[3], 拟南芥中被发现了 3 个 *GID1s* 同源基因^[16]. 目前, *GID1s* 蛋白已经在多种植物中被克隆获得, 本研究利用已公布的茶树基因组数据库, 在全基因组水平上分析鉴定, 并从‘福鼎大白’茶树中克隆获得 3 个 *CsGID1s* 基因: *CsGID1A*, *CsGID1B* 和 *CsGID1C*, 其分子量、等电点与其编码区长度均与拟南芥中 *GID1s* 蛋白具有高度的同源性, 且均定位于细胞核(表 2). 茶树中的 *GID1s* 蛋白的数量与拟南芥相同. 茶树的 3 个 *CsGID1s* 蛋白的二级结构、三级结构与拟南芥^[16]、水稻^[3]、葡萄^[4]等植物的 *GID1s* 蛋白高度相似, 含有植物 *GID1s* 家族成员的 TWVLIS, LDR, FFHGGSF, HS, IYD, YRR, DGW, GDSSGNI, GNI, MF, LDGKYF, WYW 和 GFY 等多个在植物生长发育过程中起重要调控作用的特征性结构域(图 4), 说明茶树的 *CsGID1s* 蛋白也高度保守, 是参与茶树 GA 信号转导相关的生长发育过程调控的重要蛋白.

GID1s 受体广泛参与种子萌发、茎的伸长、花器官分化及果实发育和逆境胁迫响应等植物生长发育过程的调控. *GID1s* 可打破唐菖蒲、山药的种子休眠过程, 促进萌发^[17-18]; 龙眼 *GID1* 蛋白能促进植株增高, 促进花苞发育^[14]; 辣椒 *GID1* 可以促进茎的伸长^[19]. 此外, 还发现葡萄中该基因对单性结实及果实形成过程有重要作用^[20], 在茶树中越冬芽解除休眠与 GA 及其受体基因也有关系^[21]. 茶树 *CsGID1s* 基因在不同组织部位中的表达量不同, 且在叶片和花的不同发育阶段其表达量也有明显不同, 说明 *CsGID1s* 基因在茶树不同组织及不同发育时期通过调控不同的代谢途径而发挥不同的生理功能. 在 16 种不同的山茶科植物中, *CsGID1s* 的表达量也存在明显差异, 这可能与不同的属种间发芽早晚、开花多少等生理特性有关.

启动子顺式作用元件分析发现, 茶树 *CsGID1s* 基因的启动子序列中均含有 GA 相应元件, 另外还含有逆境胁迫响应元件. 使用外源 GA3 对茶苗进行胁迫处理, 在低浓度、处理时间较短时, *CsGID1s* 基因的表达受到抑制; 在高浓度、处理时间较长时, *CsGID1s* 基因的表达会被诱导, 推测 *CsGID1* 基因的转录水平受到 GAs 的反馈抑制调节, 该结论与板栗^[22]、棉花^[23]、葡萄^[4]的研究结果一致. 且茶树 *CsGID1s* 蛋白还能与赤霉素 GA 的合成、结合及其运输等代谢过程有关的 DELLA, GA3, SLY 及 GA3OX1 等蛋白相互作用, 共同参与茶树的 GA 信号转导过程. 由此可知, *CsGID1s* 家族成员参与茶树对外源 GA 及其他非生物逆境的响应过程.

系统进化关系表明茶树与葡萄亲缘关系最近, 两者同属双子叶植物, *VvGID1s* 蛋白通过赤霉素信号转导途径来调控葡萄果实发育, 从而为无籽葡萄的生产提供理论依据^[24]. 本研究推测茶树 *CsGID1s* 蛋白可通过赤霉素 GA 信号转导途径调控茶树生殖生长与营养生长的转化过程, 对茶树增产等经济价值有着十分重要的意义. 此外, 茶树中 *GID1s* 蛋白对茶树形态学建成及抗逆过程起着重要的调节作用, 进一步研究 GA 受体在茶树生长发育过程中的调解机制对茶树果实的发育以及茶芽越冬管理有着十分必要的参考价值.

4 结论

本研究从茶树基因组中克隆获得 3 个茶树 GA 受体蛋白基因: *CsGID1A*, *CsGID1B* 和 *CsGID1C*. 茶树 *CsGID1s* 蛋白具有高度的保守性; *CsGID1s* 基因存在组织表达时空特异性, 且受到外源 GA3 和其他非生物逆境的影响. 根据本研究结果推断 *CsGID1s* 基因家族成员广泛参与了茶树中赤霉素 GA 信号转导途径及其他非生物逆境胁迫的响应过程, 为深入分析茶树 GA 受体蛋白的功能提供了一定参考.

参考文献:

- [1] 齐蒙, 李国瑞, 黄凤兰, 等. 赤霉素的代谢途径及其受体 *GID1* 的功能研究进展 [J]. 种子科技, 2017, 35(4): 122-123.
- [2] 左圆圆, 周杨杨, 李小平. 植物激素-赤霉素(GA)细胞信号转导机制 [J]. 淮北师范大学学报(自然科学版), 2011, 32(2): 49-54.
- [3] UEGUCHI-TANAKA M, ASHIKARI M, NAKAJIMA M, et al. Gibberellin Insensitive Dwar F₁ Encodes a Soluble Receptor for Gibberellin [J]. Nature, 2005, 437(7059): 693-698.

- [4] 王西成, 吴伟民, 房经贵, 等. 葡萄赤霉素受体基因 *VvGID1A* 的分离、亚细胞定位及表达分析 [J]. 园艺学报, 2013, 40(5): 839-848.
- [5] EL-SHARKAWY I, SHERIF S, EL KAYAL W, et al. Characterization of Gibberellin-signalling Elements during Plum Fruit Ontogeny Defines the Essentiality of Gibberellin in Fruit Development [J]. Plant Molecular Biology, 2014, 84(4): 399-413.
- [6] 申世辉. 纽荷尔脐橙中赤霉素受体基因 *CsGID1* 的功能分析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
- [7] 岳建华, 张荻, 申晓辉. 百子莲赤霉素受体基因 *ApGID1* 全长的克隆及功能分析 [J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2017, 35(1): 1-8.
- [8] HIRANO K, UEGUCHI-TANAKA M, MATSUOKA M. *GID1*-mediated Gibberellin Signaling in Plants [J]. Trends in Plant Science, 2008, 13(4): 192-199.
- [9] SUN T P. Gibberellin Metabolism, Perception and Signaling Pathways in *Arabidopsis* [J]. The Arabidopsis Book, 2008, 6: e0103.
- [10] MAURIAT M, MORITZ T. Analyses of *GA20ox*- and *GID1*-over-expressing Aspen Suggest that Gibberellins Play Two Distinct Roles in Wood Formation [J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2009, 58(6): 989-1003.
- [11] HAUVERMALE A L, ARIIZUMI T, STEBER C M. The Roles of the GA Receptors *GID1a*, *GID1b*, and *GID1c* in *Sly1*-Independent GA Signaling [J]. Plant Signaling & Behavior, 2014, 9(2): e28030.
- [12] GRIFFITHS J, MURASE K, RIEU I, et al. Genetic Characterization and Functional Analysis of the *GID1* Gibberellin Receptors in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2006, 18(12): 3399-3414.
- [13] WILLIGE B C, GHOSH S, NILL C, et al. The *DELLA* Domain of GA Insensitive Mediates the Interaction with the GA Insensitive Dwarf1a Gibberellin Receptor of *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2007, 19(4): 1209-1220.
- [14] 郭栋梁, 翟世博, 王静, 等. 龙眼 GA 信号受体基因 *LonGID1* 的功能初步分析 [J]. 分子植物育种, 2019, 17(7): 2109-2116.
- [15] 陈敏. 紫花苜蓿赤霉素受体基因 *MsGID1b* 的克隆及功能分析 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.
- [16] NAKAJIMA M, SHIMADA A, TAKASHI Y, et al. Identification and Characterization of *Arabidopsis* Gibberellin Receptors [J]. The Plant Journal, 2006, 46(5): 880-889.
- [17] 罗弦, 陆涵, 袁雷, 等. 唐菖蒲赤霉素受体基因克隆及表达分析 [J]. 西北植物学报, 2016, 36(11): 2152-2158.
- [18] 龙雯虹, 孟金贵, 徐升胜, 等. 山药赤霉素受体基因 *DoGID1A* 的克隆及表达分析 [J]. 农业生物技术学报, 2019, 27(11): 1933-1941.
- [19] 曹亚从. 辣椒果实细胞学、转录组分析及赤霉素受体 *CaGID1s* 和 *DELLA* 蛋白 *CaGAI* 功能、互作研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
- [20] 葛晖, 赵晓, 王增, 等. 葡萄 GA 受体基因 *GID1* 初探及其在果实 GA 处理条件下的差异表达 [J]. 中国农业大学学报, 2011, 16(2): 58-63.
- [21] 岳川, 曾建明, 曹红利, 等. 茶树赤霉素受体基因 *CsGID1a* 的克隆与表达分析 [J]. 作物学报, 2013, 39(4): 599-608.
- [22] 李兴亮, 郭献平, 沈元月, 等. 板栗赤霉素缺陷型短雄花序芽变的初步鉴定及 *CmGID1* 基因的表达分析 [J]. 园艺学报, 2011, 38(7): 1251-1258.
- [23] 董静, 尹梦回, 杨帆, 等. 棉花赤霉素不敏感矮化 *GID1* 同源基因的克隆和表达分析 [J]. 作物学报, 2009, 35(10): 1822-1830.
- [24] 金良, 葛晖, 陈尚武, 等. 2 个葡萄 *GID* (Gibberellin Insensitive Dwarf) 基因的克隆与表达 [J]. 中国农业大学学报, 2013, 18(4): 64-70.