

## 茶树在干旱条件下的 mRNA 差异表达

陈盛相, 齐桂年\*, 夏建冰, 邹瑶, 单虹丽

四川农业大学园艺学院茶学系, 四川 雅安 625014

**摘要:** 采用 20%PEG-6000 对福鼎大白茶无性系扦插苗进行模拟干旱处理, 应用 mRNA 差异显示技术研究干旱与正常浇水对照的 mRNA 差异表达, 发现 1 个在干旱条件下减量表达片段 N<sub>3.5</sub>。序列分析和同源性比对表明, N<sub>3.5</sub> 与茶树无性系 Sajin 茶叶色突变基因组序列标签 S31.B15 (Accession: DQ443473.1) 有 75% 的同源性。根据序列相似同源基因的功能推测, 该片段可能与茶树的抗旱机制有关。

**关键词:** 茶树; 干旱胁迫; mRNA 差异表达

中图分类号: S571.1; Q756

文献标识码: A

文章编号: 1000-369X(2012)01-053-06

## mRNA Differential Expression of *Camellia sinensis* under Drought Conditions

CHEN Sheng-xiang, QI Gui-nian\*, XIA Jian-bing, ZOU Yao, SHAN Hong-li

Department of tea Science, College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

**Abstract:** 20% PEG-6000 was used for simulating drought treatment to *Camellia sinensis* cv. *Fuding-dabaicha* clone. mRNA differential display reverse transcriptase polymerase chain reaction (DDRT-PCR) was used to study the mRNA differential expression between drought stress and irrigated control. One down regulated gene was found under drought stress. Sequence analysis and homology alignment showed that N<sub>3.5</sub> showed 75% homogeneity with the *Camellia sinensis* clone Sajin tea leaf mutant color tag S31.B15 genomic sequence (Accession: DQ443473.1). It was suggested that the fragments N<sub>3.5</sub> was related to drought tolerance mechanism of tea plant according to the functions of their homologous sequences.

**Keywords:** *Camellia sinensis*, drought stress, mRNA differential expression

我国茶叶主产区在长江中下游一带, 每年夏秋期间, 晴日多, 气温高, 空气湿度低, 蒸发量大, 常有伏旱和秋旱发生, 对茶树生长以及茶叶产量和品质造成较大影响, 严重时甚至使茶树受害致死, 旱害已经成为茶叶生产中一个较为突出的问题<sup>[1]</sup>。目前对茶树抗旱性方面的研究在生理方面较多<sup>[2-5]</sup>, 而在分子方面研究较少<sup>[6-7]</sup>。为此, 本研究采用 20% PEG-6000 对 2 年生福鼎大白茶无性系扦插苗 (*Camellia*

*sinensis* cv. *Fuding-dabaicha*) 进行干旱胁迫, 通过观察了福鼎大白茶的叶片形态变化, 同时应用 mRNA 差异显示技术 (DDRT-PCR) 研究干旱与正常浇水的 mRNA 差异表达, 克隆测序差异片段, 并进行生物信息学分析, 以期获得与抗旱性相关的序列信息, 为进一步深入研究茶树抗旱的分子机制奠定基础。

### 1 材料与方法

收稿日期: 2011-09-13

修订日期: 2011-11-01

基金项目: 四川省科技厅项目 (2009-NZ0015)

作者简介: 陈盛相 (1981—), 男, 福建龙岩人, 在读博士生, 主要从事茶树分子生物学研究。\*通讯作者: guinian5612@sina.com

### 1.1 材料

供试材料为 2 年生福鼎大白茶无性系扦插苗。选择长势、大小基本一致的扦插苗移栽到 1/2 剂量的 Hoagland 营养液中进行修复培养, 置于温室自然光照, 每天定时通气。3 d 后, 将茶苗随机分成 2 组, 每组 5 瓶, 其中一组采用 20% 聚乙二醇 (PEG-6000) 溶液进行水分子胁迫培养, 另一组以等体积蒸馏水培养作为对照 (CK), 分别在 1 d (P<sub>1</sub>)、2 d (P<sub>2</sub>)、3 d (P<sub>3</sub>)

取第二叶位的叶片, 液氮速冻后 -70℃ 保存。

本试验所采用的 DDRT-PCR 引物借鉴相关文献<sup>[8-9]</sup>, 由上海英俊生物技术公司合成。引物具体序列见表 1。

### 1.2 总 RNA 提取

用北京天恩泽基因科技有限公司的柱式植物 RNAout 提取试剂盒, 按照说明书的要求提取总 RNA, 然后以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量。

表 1 引物类型与组成

Table 1 Composition and nature of the primers

| 引物类型<br>Primer          | 引物命名<br>Name    | 引物序列<br>Sequence                 | 引物命名<br>Name     | 引物序列<br>Sequence                 | 引物命名<br>Name     | 引物序列<br>Sequence                 |
|-------------------------|-----------------|----------------------------------|------------------|----------------------------------|------------------|----------------------------------|
| 锚定引物<br>Anchored primer | AP <sub>1</sub> | 5'-Oligo d(T) <sub>11</sub> A-3' | AP <sub>2</sub>  | 5'-Oligo d(T) <sub>11</sub> G-3' | AP <sub>3</sub>  | 5'-Oligo d(T) <sub>11</sub> C-3' |
| 随机引物<br>Random primer   | RP <sub>1</sub> | 5'-TACAACGAGG-3'                 | RP <sub>7</sub>  | 5'-GGAACCAATC-3'                 | RP <sub>13</sub> | 5'-TGCTGGTGG-3'                  |
|                         | RP <sub>2</sub> | 5'-TTTTGGCTCC-3'                 | RP <sub>8</sub>  | 5'-CTGCTTGATG-3'                 | RP <sub>14</sub> | 5'-TGCTGGTAG-3'                  |
|                         | RP <sub>3</sub> | 5'-TCGGTCATAG-3'                 | RP <sub>9</sub>  | 5'-CTTTCTACCA-3'                 | RP <sub>15</sub> | 5'-TGCTGGGTG-3'                  |
|                         | RP <sub>4</sub> | 5'-GATCTGACAC-3'                 | RP <sub>10</sub> | 5'-GATCGCATTG-3'                 | RP <sub>16</sub> | 5'-TGCTGTATG-3'                  |
|                         | RP <sub>5</sub> | 5'-GATCAATCGC-3'                 | RP <sub>11</sub> | 5'-GATCTGACTG-3'                 | RP <sub>17</sub> | 5'-TGGAGCTGG-3'                  |
|                         | RP <sub>6</sub> | 5'-GGTACATTGG-3'                 | RP <sub>12</sub> | 5'-TGCTGGGGA-3'                  | RP <sub>18</sub> | 5'-TGTGGCAGG-3'                  |

### 1.3 逆转录及 DDRT-PCR

根据 Revert Aid<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas Company, CA) 说明书的要求, 以 AP<sub>1-3</sub> 引物分别对不同的试验材料的总 RNA 进行逆转录, 获得 cDNA。再以稀释 4 倍的 cDNA 为模板, 用表 1 中随机引物 RP<sub>1-18</sub> 和 3 个锚定引物 AP<sub>1-3</sub> 按照以下反应体系和程序在 MyCycler<sup>TM</sup> Thermal Cycler 580BR PCR 仪上 (BIO-RAD Company, USA) 进行 3×18 组合的 DDRT-PCR 反应: ddH<sub>2</sub>O 14 μL, cDNA 2 μL, AP 1 μL, RP 1 μL, Mix 12.5 μL; 95℃ 5 min, 95℃ 45 s, 45℃ 45 s, 72℃ 90 s, 35 个循环, 72℃ 10 min。PCR 结束后, 将 PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳结束后置于 Gel Doc TY4133 (BIO-RAD, USA) 凝胶成像系统中显示, 拍照。

### 1.4 差异条带回收、二次扩增

用灭菌的手术刀从凝胶上切取差异条带,

放入 1.5 mL 离心管中, 按照 E.Z.N.A.<sup>TM</sup> Gel Extraction Kit (OMEGA, USA) 说明书进行回收并按照 1.3 的体系和程序进行二次扩增。二次扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 拍照, 并回收纯化。

### 1.5 差异条带的克隆、测序、鉴定和同源性分析

将回收的差异条带连接到 pMD19-T Simple Vector (TAKARA BIO INC., JAP), 并转化到感受态细胞 *E. coli* DH5α 中, 用蓝白斑鉴定的方法, 初步选择出白斑阳性克隆, 进一步用 M13 引物进行菌落 PCR 鉴定, 将阳性克隆穿刺培养后送至上海英俊公司测序。登陆 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 查询其同源序列, 再用 Blast 分析差异片段与其同源序列的相似性。

## 2 结果与分析

### 2.1 茶树叶片的形态变化

干旱胁迫 3 d 后,福鼎大白茶在正常浇水条件下叶片没有出现明显的变化(图 1-A),但是它在干旱胁迫下却出现了显著的形态变化(图 1-B),如顶部幼叶首先萎蔫,叶片泛红并出现焦斑,继而整叶枯焦,同时老叶叶色变为黄绿、淡红,茎轻折易断等旱害症状。

## 2.2 茶树叶片总 RNA 的质量检测

4 个样品的 28 S 和 18 S rRNA 带型分明, RNA 降解不明显,可以用于逆转录反应(图 2)。

## 2.3 茶树叶片中基因表达的差异

由 3 个 3'端锚定引物与 18 个 5'端随机引物组成的 54 个引物组合,对干旱处理 1、2、3 d 及对照的逆转录 cDNA 模板,均能扩增出特异条带。为减小实验误差,经过筛选,选择

条带差异好的组合按照上述反应条件和反应参数重新进行 1 次 PCR,图 3 显示了部分差异表达片段的琼脂糖凝胶电泳结果。通过琼脂糖凝胶电泳,可以看出茶树在干旱胁迫前后,其 cDNA 条带存在着明显的差异,这说明茶树叶片在干旱胁迫处理后的基因表达出现了改变。其中,在引物组合 AP<sub>3</sub>/RP<sub>5</sub> 扩增的条带中,有 1 个约 500 bp 的特异条带,在干旱处理 1、2、3 d 及对照均有表达,但干旱条件下的表达量始终低于正常浇水的对照。将这个干旱条件下减量表达的片段,命名为 N<sub>3-5</sub>。

## 2.4 菌落 PCR 鉴定结果

对挑选的白斑进行菌落 PCR,进一步鉴定是否为阳性(图 4)。根据菌落 PCR 结果,选取阳性克隆,穿刺培养后送至生物公司测序。

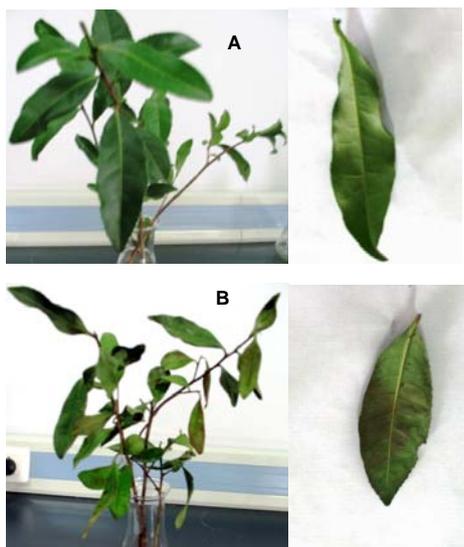


图 1 福鼎大白茶在正常浇水(A)和干旱胁迫下(B)的叶片形态

Fig. 1 Morphological changes of *Camellia sinensis* cv. *Fuding-dabaicha* under irrigation and drought

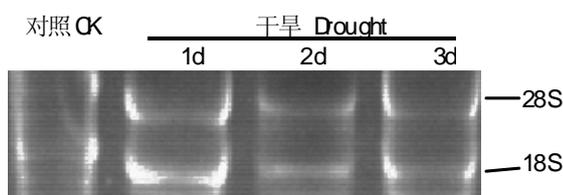


图 2 总 RNA 样品的琼脂糖凝胶电泳检测

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis detection of total RNA samples

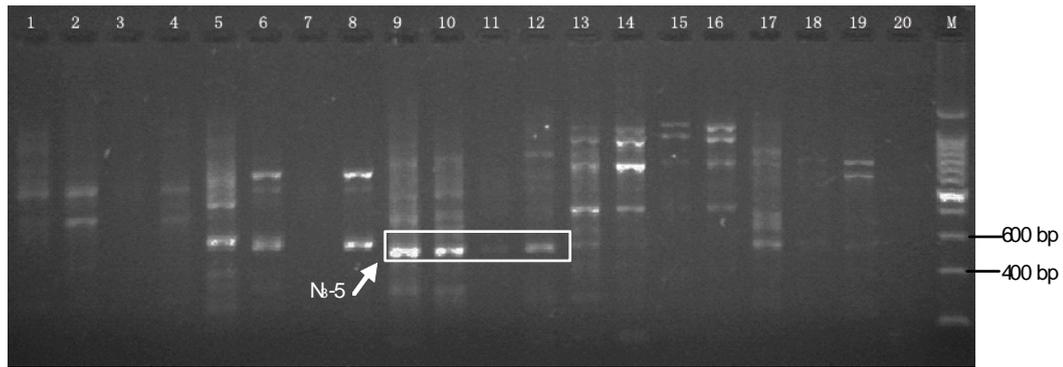


图 3 不同引物 DDRT-PCR 扩增结果

Fig. 3 DDRT-PCR amplified result with different primer combination

注: Nx-z, N 表示对照样, x 表示锚定引物序号, z 表示随机引物序号; PaY<sub>x-z</sub>, PY 表示处理样, a 表示处理时间, x、z 表示含义同上。M: 200 bp DNA Ladder Mark, 1: N<sub>3-2</sub>, 2: P<sub>1</sub>Y<sub>3-2</sub>, 3: P<sub>2</sub>Y<sub>3-2</sub>, 4: P<sub>3</sub>Y<sub>3-2</sub>, 5: N<sub>3-4</sub>, 6: P<sub>1</sub>Y<sub>3-4</sub>, 7: P<sub>2</sub>Y<sub>3-4</sub>, 8: P<sub>3</sub>Y<sub>3-4</sub>, 9: N<sub>3-5</sub>, 10: P<sub>1</sub>Y<sub>3-5</sub>, 11: P<sub>2</sub>Y<sub>3-5</sub>, 12: P<sub>3</sub>Y<sub>3-5</sub>, 13: N<sub>3-8</sub>, 14: P<sub>1</sub>Y<sub>3-8</sub>, 15: P<sub>2</sub>Y<sub>3-8</sub>, 16: P<sub>3</sub>Y<sub>3-8</sub>, 17: N<sub>3-10</sub>, 18: P<sub>1</sub>Y<sub>3-10</sub>, 19: P<sub>2</sub>Y<sub>3-10</sub>, 20: P<sub>3</sub>Y<sub>3-10</sub>。

Note: In Nx-z, N means contol, x means anchored sequence, z means random sequence. In PaY<sub>x-z</sub>, a means treated time, x and z mean that of the former. M: 200 bp DNA Ladder Mark, 1: N<sub>3-2</sub>, 2: P<sub>1</sub>Y<sub>3-2</sub>, 3: P<sub>2</sub>Y<sub>3-2</sub>, 4: P<sub>3</sub>Y<sub>3-2</sub>, 5: N<sub>3-4</sub>, 6: P<sub>1</sub>Y<sub>3-4</sub>, 7: P<sub>2</sub>Y<sub>3-4</sub>, 8: P<sub>3</sub>Y<sub>3-4</sub>, 9: N<sub>3-5</sub>, 10: P<sub>1</sub>Y<sub>3-5</sub>, 11: P<sub>2</sub>Y<sub>3-5</sub>, 12: P<sub>3</sub>Y<sub>3-5</sub>, 13: N<sub>3-8</sub>, 14: P<sub>1</sub>Y<sub>3-8</sub>, 15: P<sub>2</sub>Y<sub>3-8</sub>, 16: P<sub>3</sub>Y<sub>3-8</sub>, 17: N<sub>3-10</sub>, 18: P<sub>1</sub>Y<sub>3-10</sub>, 19: P<sub>2</sub>Y<sub>3-10</sub>, 20: P<sub>3</sub>Y<sub>3-10</sub>。

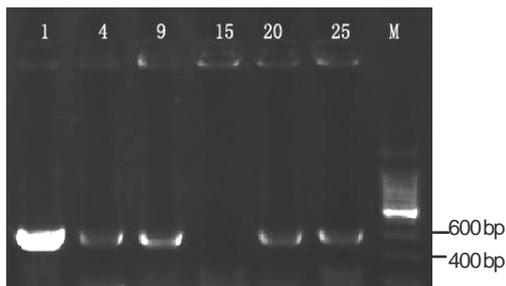


图 4 菌落 PCR

Fig. 4 PCR amplified result of colony

注: 阳性克隆: 1、4、9、20、25; 阴性克隆: 15。

Note: Positive cloning: 1, 4, 9, 20, 25. Negative cloning: 15.

## 2.5 差异片段的序列比对分析结果

将阳性片段的序列信息提交 NCBI 进行 BLAST 比对分析, 结果发现, 目的片段 N<sub>3-5</sub> (图 5) 和已知序列茶树无性系 Sajin 茶叶色突变基因组序列标签 S31.B15 (Accession: DQ443473.1) 有较高相似性, 为 75%, 和利用鸟枪法得到的多个葡萄基因组片段有较高的相似性, 最高为 72%。

## 3 讨论

DDRT-PCR 自 1992 年美国哈佛医学院的

两名科学家 P. Liang 和 A.D Pardee 提出后, 因其操作简便、快速, 且能同时进行两组或两组以上样品的分析、比较, 已成功应用于多种植物抗性方面的研究, 如对玉米耐旱性自交系在干旱条件下的 mRNA 差异表达分析, 发现了玉米中与参与内含子剪切有关的基因、丝氨酸/苏氨酸 2C 型蛋白磷酸酶基因、与程序性死亡有关的基因有较大相似性的基因片段<sup>[10]</sup>; 通过对花生干旱胁迫下表达差异的研究得到了和抗旱相关的多条差异条带, 为进一步研究打下基础<sup>[11]</sup>; 对茶树被茶尺蠖取食后基因表达谱差异的研究, 发现了多条与抗虫性相关的基因<sup>[12]</sup>; 通过对小麦苗期水分胁迫诱导差异表达 cDNA 的研究, 用基因差异表达现象解释了植物的交叉适应 (Cross adaptation) 现象, 即植物受到一种逆境胁迫时产生的应答与对受到其他逆境胁迫的应答有内在的相关性<sup>[13]</sup>。

本研究发现茶树在受到干旱胁迫后基因表达谱有明显的差异, 而在这些差异表达基因中, 发现 1 个在干旱条件下减量表达片段 N<sub>3-5</sub>, 是与色素较接近的基因片段。一般认为, 色素在维持叶色、花色方面起重要作用, 但是随着

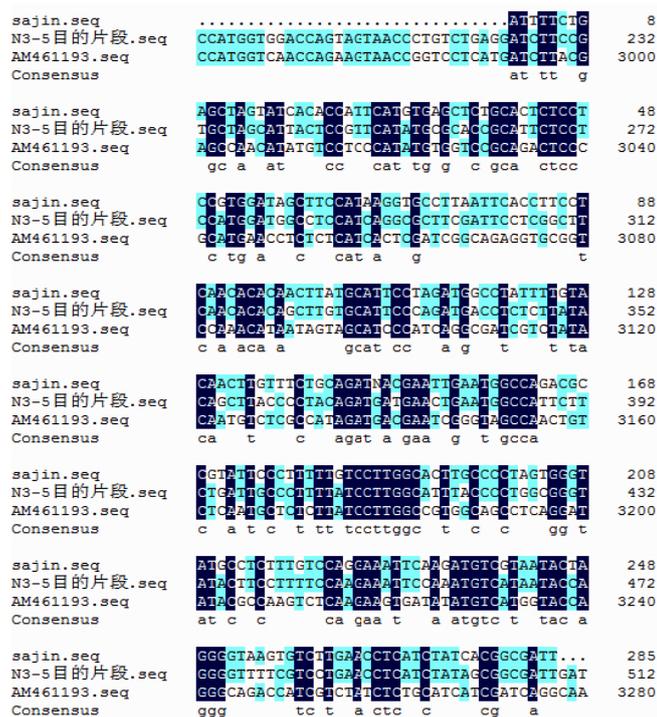


图 5 N3-5 的碱基序列与 Sajin 茶叶色突变基因组序列标签 S31.B1 及葡萄基因组片段的相似性比对

Fig. 5 Comparison on the similarity of Base sequence of N3-5 alignment with Sajin tea leaf mutant color tag S31.B15 and AM461193.seq

研究的深入, 发现作为一种次生代谢产物, 有些色素还有其他的生理功能。花青素是研究得较为广泛的一种色素, 属于酚类化合物中的类黄酮类, 是植物的次生代谢产物, 也是植物中的水溶性色素, 决定着花、果实、种子的颜色<sup>[14]</sup>, 广泛存在于 27 个科和 72 个属的被子植物中<sup>[15]</sup>, 如花青素含量较高的植物有茶叶、葡萄、银杏等。它是经苯基丙酸路径和类黄酮合成途径生成, 受多个调节基因的调节, 其中 MYB 蛋白是植物花青素合成涉及最为广泛的调节因子, 而 MYB 是植物主要的与逆境抗性相关的 4 类转录因子之一, 在植物胁迫应答过程中起着重要的调控作用<sup>[16-17]</sup>。在植物组织器官中, 类黄酮化合物的积累是植物应答逆境胁迫的一个重要特性, 在生物因子胁迫和非生物因子胁迫中 MYB 因子在植物应答过程中都有重要的调控作用<sup>[18]</sup>, 近年来克隆的多个 MYB 类转录因子新基因均有抗旱、耐高温和低温等

作用, 如拟南芥的 *AtMYB2*<sup>[19]</sup>和 *AtMYB60*<sup>[20]</sup>被证实参与植物耐旱胁迫过程, 水稻中的 *osmyb4* 基因高量表达能显著提高转基因作物对干旱、高盐、UV 辐射的耐受性<sup>[21]</sup>。有研究认为, 随着水分胁迫程度的加重, 花青素含量呈逐渐增加的趋势, 并且与之合成相关的苯丙氨酸裂解酶 (PAL) 活性也呈上升趋势<sup>[22]</sup>, 但 Kashmir Singh 认为, 茶叶中的花青素还原酶 (*CsANR*) 表达在干旱胁迫下呈下调表达<sup>[23]</sup>。在本实验中, 目的片段 N<sub>3.5</sub> 随着干旱胁迫时间的延长表达量逐渐降低, 推测该片段不仅和叶色变化相关, 也和抗旱性有一定的联系。但是, 关于花青素和茶树抗旱性的直接关系还需要进一步研究。

## 参考文献

- [1] 孙世利, 骆耀平. 茶树抗旱性研究进展[J]. 浙江农业科学, 2006(1): 89-91.

- [2] 潘根生, 吴伯千, 沈生荣, 等. 水分胁迫过程中茶树新梢内源激素水平的消长及其与耐旱性的关系[J]. 中国农业科学, 1996, 29(5): 9-15.
- [3] 陆德彪, 童启庆, 骆耀平, 等. 茶树种质资源抗旱性的综合评价[J]. 浙江农业大学学报, 1995, 21(5): 447-450.
- [4] 吴伯千, 潘根生. 茶树对水分胁迫的生理生化反应[J]. 浙江农业大学学报, 1995, 21(5): 451-456.
- [5] 陆德彪, 童启庆. 茶苗在干旱胁迫下的伤害及其生理原因的探讨[J]. 浙江农业大学学报, 1992, 18(增): 56-62.
- [6] Rajan K Mishra, Swati SEN-Mandi. Genome analysis and isozyme studies for developing molecular markers associated with drought tolerance in tea plant [C]//Production Proceedings of 2001ICOS: Session II. Shizuoka, 2001: 66-69.
- [7] 郭春芳, 孙云, 赖呈纯, 等. 聚乙二醇胁迫下茶树叶片的蛋白质组分析[J]. 茶叶科学, 2009, 29(2): 79-88.
- [8] 沙莉娜, 付凤玲, 李晚忱. 玉米耐旱自交系在干旱条件下的 mRNA 差异表达[J]. 核农学报, 2006, 20(5): 365-370.
- [9] Ashok K. Jain, Sheikh Mehboob Basha, C. Corley Holbrook. Identification of drought-responsive transcripts in peanut(*Arachis hypogaea* L.)[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2001, 4(2): 59-67.
- [10] 罗凡, 王云, 李春华, 等. 四川茶树品种研究现状与发展趋势[J]. 贵州科学, 2008, 26(2): 52-57.
- [11] 陈善福, 舒庆尧. 植物耐干旱胁迫的生物学机理及其基因工程研究进展[J]. 植物学通报, 1999, 16(5): 555-560.
- [12] 韦朝领, 高香凤, 叶爱华, 等. 基于 DDRT-PCR 研究茶树对茶尺蠖取食诱导的基因表达谱差异[J]. 茶叶科学, 2007, 27(2): 133-140.
- [13] 郭宾会, 高双成, 景蕊莲, 等. 小麦苗期水分胁迫诱导差异表达 cDNA 的研究[J]. 生物技术通报, 2003(2): 40-45.
- [14] 刘娟, 冯群芳, 张杰. 二氢黄酮醇 4-还原酶基因 (DFR) 与花色的修饰[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(6): 715-719.
- [15] Annamaryju D S. Antioxidant ability of anthocyanins against ascorbic acid oxidation[J]. Phytochemistry, 1997, 45(4): 671-674.
- [16] 赵云龙, 王世雷. 植物花青素研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(8): 3095-3097.
- [17] 许志茹, 李春雷, 崔国新, 等. 植物花青素合成中的 MYB 蛋白[J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(3): 597-604.
- [18] 刘蕾, 杜海, 唐晓凤, 等. MYB 转录因子在植物抗逆胁迫中的作用及其分子机理[J]. 遗传, 2008, 30(10): 1265-1271.
- [19] Hoeren FU, Dolferus R, Wu Y, *et al.* Evidence for a role for *AtMYB2* in the induction of the *Arabidopsis* alcohol dehydrogenase gene (*ADH1*) by low oxygen[J]. Genetics, 1998, 149(2): 479-490.
- [20] Cominelli E, Galbiati M, Vavasseur A, *et al.* Aguard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance[J]. Curr Biol, 2005, 15(13): 1196-2000.
- [21] Vannini C, Locatelli F, Bracale M, *et al.* Overexpression of the rice Osmyb4 gene increases chilling and freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants[J]. Plant Journal, 2004, 37(1): 115-127.
- [22] 许丽颖, 赫玉苹, 王刚, 等. 水分胁迫对紫色李叶片色素含量与 PAL 活性的影响[J]. 吉林农业大学学报, 2007, 29(2): 168-172.
- [23] Kashmir Singh, Arti Rani, Asosii Paul, *et al.* Differential display mediated cloning of anthocyanidin reductase gene from tea (*Camellia sinensis*) and its relationship with the concentration of epicatechins[J]. Oxford Journals Tree Physiology, 2009, 26(6): 837-846.