

引文格式: 胡小莉, 付一丹, 崔 懂, 等. 茶树休眠相关基因 *CsAGL8* 的克隆与表达分析[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2023, 38(6): 1032–1040. DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).202208037](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).202208037)

茶树休眠相关基因 *CsAGL8* 的克隆与表达分析*

胡小莉^{1,2#}, 付一丹^{1#}, 崔 懂^{1,2}, 夏心杰¹, 陈盛相^{1,2}, 唐 茜^{1,2}, 谭礼强^{1,2**}

(1. 四川农业大学 园艺学院, 四川 成都 611130; 2. 精制川茶四川省重点实验室, 四川 成都 611130)

摘要:【目的】克隆茶树 *CsAGL8* 基因序列, 并探究该基因与茶树休眠的关系。【方法】以峨眉问春等茶树品种的休眠芽为材料, 采用 RT-PCR 扩增 *MADS-box* 转录因子家族基因 *CsAGL8*, 并进行 BLAST 比对等生物信息学分析; 采用实时荧光定量 PCR 检测 *CsAGL8* 在茶树 8 个组织和越冬期间的相对表达量; 遗传转化拟南芥, 对转基因植株进行表型观测及开花相关基因分析。【结果】*CsAGL8* 的 CDS 全长为 720 bp, 编码 239 个氨基酸, 含有高度保守的 *MADS-box* 结构域和半保守的 K-box 结构域, 与拟南芥的 *AtAGL8* 相似性最高。*CsAGL8* 编码区表现出一定的多态性, 启动子区域存在较多的光、激素和胁迫响应等顺式作用元件。表达分析表明: *CsAGL8* 在茶树不同组织中均有表达, 在休眠顶芽中的表达量最高; 越冬期间, *CsAGL8* 的表达量呈先升高后降低的趋势, 在特早生品种峨眉问春芽中的相对表达量显著低于对照品种, 且下调时间早于对照品种。过表达 *CsAGL8*, 拟南芥转基因植株会早花 10~15 d。【结论】*CsAGL8* 可能参与了茶树越冬休眠调控。

关键词: 茶树; *MADS-box*; 基因克隆; 表达分析; 休眠

中图分类号: S571.101

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X (2023) 06-1032-09

Cloning and Expression Analysis of a *MADS-box* Gene *CsAGL8* in the Tea Plant (*Camellia sinensis*)

HU Xiaoli^{1,2}, FU Yidan¹, CUI Dong^{1,2}, XIA Xinjie¹, CHEN Shengxiang^{1,2},

TANG Qian^{1,2}, TAN Liqiang^{1,2}

(1. College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2. Tea Refining and Innovation Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu 611130, China)

Abstract: [Purpose] To clone the *CsAGL8* gene sequence of tea plant and to explore the relationship between this gene and tea plant dormancy. [Methods] The *MADS-box* transcription factor family gene *CsAGL8* was cloned from the dormant buds of the tea cultivar ‘Emei Wenchun’ by RT-PCR, and bioinformatics analysis such as BLAST comparison was performed. The relative expression levels in eight tissue samples and during overwintering were determined by qPCR. Genetic transformation of *Arabidopsis thaliana*, to observe the phenotype of transgenic plants and analyze the flowering-related genes. [Results] The CDS of *CsAGL8* was 720 bp, which encoded 239 amino acids, and contained a highly conserved *MADS-box* domain and a semi-conserved K-box domain.

收稿日期: 2022-08-17

修回日期: 2023-11-01

网络首发日期: 2023-12-08

*基金项目: 国家自然科学基金项目 (31800589); 大学生创新性实验计划项目 (202010626132); 四川省科技计划项目 (2022JDRC0035)。

作者简介: #对本文贡献等同, 为并列第一作者。胡小莉 (1997—), 女, 重庆人, 在读硕士研究生, 主要从事茶树栽培与遗传育种研究。E-mail: 745836672@qq.com; 付一丹 (2000—), 女, 河南濮阳人, 在读硕士研究生, 主要从事茶树栽培与遗传育种研究。E-mail: 2540113464@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 谭礼强 (1987—), 男, 重庆人, 博士, 副教授, 主要从事茶树遗传育种与栽培研究。E-mail: tanliqiang@sicau.edu.cn

网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/53.1044.S.20231207.1044.002>



CsAGL8 showed the highest similarity to *AtAGL8* from *A. thaliana*. The coding region of *CsAGL8* showed polymorphisms, and many *cis*-acting elements such as light, hormone, and stress response were found in the promoter region. Expression analysis showed that *CsAGL8* was expressed in different tissues of tea plants, and the highest expression was detected in the dormant terminal buds. During the overwintering process, the expression of *CsAGL8* increased first and then decreased. Compared with the regular tea cultivar, the expression levels of *CsAGL8* were not only significantly lower, but also down-regulated earlier in the buds of the extra-early cultivar 'Emei Wenchun'. Overexpression of *CsAGL8* in *A. thaliana* promoted early flowering for 10-15 days. [Conclusion] *CsAGL8* may be involved in the regulation of winter dormancy in tea plants.

Keywords: *Camellia sinensis*; MADS-box; gene cloning; expression analysis; dormancy

芽休眠是植物抵抗低温和短日照等不利生长环境的一种自我保护机制,受光照、温度、激素和遗传等调控^[1-2],在生长发育过程中具有至关重要的作用。在遗传调控方面,*MADS-box* 转录因子家族被广泛证明参与了植物芽休眠、种子休眠和开花等生长发育过程的调控^[3-5],其中,Dormancy Associated MADS-box (*DAM*) 基因属于 *MADS-box* 家族的 *MIKC^C* 型转录因子。BIELE-
NBERG 等^[6]证明桃树 (*Prunus persica*) 缺失 6 个串联的 *DAM* 基因,导致无冬季休眠现象。近年来在苹果、桃、梨、猕猴桃和茶树等植物中克隆得到 *DAM* 基因,研究结果显示其参与调控植物的芽休眠进程,对芽生长产生抑制^[7-11]。

MADS-box 家族其他成员同样在植物生长发育过程中起着重要调控作用。其中,AGAMOUS-like (*8AGL8*) 基因是 *AP1/SQUA-like* 亚家族的 A 类花器官特性基因,也称为 *FUL*,研究表明:该基因主要调控花器官发育,也能调控分裂组织分化、胚胎发育、促进根形成以及调控种子和果实发育等^[12-13]。在拟南芥中,过表达同源的桃树 *PpMADS6*、大豆 *GmAGL8* 基因会出现花期提前、单花器官增多和果荚成熟提前等表型^[14-15]。茶树 [*Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze] 作为一种叶用经济作物,休眠期长短及休眠解除时间直接影响其经济效益。峨眉问春 (Emei Wenchun, EW) 是近年来新选育的特早生茶树品种,在四川地区的种植面积较广,但其特早生、冬季短休眠性状的分子遗传机制尚不清楚。课题组前期通过转录组测序获得了 1 个可能与 EW 冬季休眠相关的基因 (编号 PB7211.1),该基因在茶树越冬休眠芽中的表达量显著高于春季萌发芽,且在特早生品种

中的表达量显著低于常规品种^[16]。根据与拟南芥蛋白质序列数据库比对结果,将该基因暂命名为 *CsAGL8*。本研究通过分子克隆得到 *CsAGL8* 基因全长序列,并利用生物信息学、基因表达及遗传转化等手段初步揭示其基因功能,以期研究茶树冬季芽休眠的分子调控机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为 5 年生的特早生茶树 EW (比福鼎大白茶萌芽早 20~30 d)^[17-18] 和对照品种川茶 2 号 (Chuancha2, CC2, 比福鼎大白茶萌芽早 2~4 d^[19])。于 2020 年 11 月 21 日—2021 年 2 月 22 日,在四川沐川一枝春基地 (N28.55°, E103.58°),每隔约 15 d 采集腋芽和幼嫩叶 (从上往下的 1、2 叶);于 2021 年 11 月下旬在四川雅安名山茶树良种繁育场 (N30.21°, E103.21°),从 5 年生 EW 上取 8 个组织样品 (根、茎、花、花苞、顶芽、嫩叶、成熟叶和老叶),液氮速冻后置于 -80 °C 超低温冰箱中保存备用。*CsAGL8* 的克隆材料还包括龙井 43 (Longjin43, LJ43) 的休眠芽;转基因材料为哥伦比亚野生型拟南芥 (Col-0),在 23 °C、12 h 光照/12 h 黑暗、相对湿度 60% 下培养。

1.2 *CsAGL8* 的克隆

以 EW、CC2 和 LJ43 的休眠芽为材料,采用 EASYspin PLUS 多糖多酚复杂植物 RNA 提取试剂盒 (RN53, 北京 Aidlab) 提取总 RNA;用 1% 琼脂糖凝胶电泳和超微量核酸蛋白检测仪 (analytikjena, 德国) 检测 RNA 完整性和浓度;利用反转录试剂盒 FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix Fastking (KR118-02, 北京天根) 合成 cDNA。

以课题组前期转录组测序得到的 *CsAGL8* 预测 ORF 序列为模板, 设计特异引物 (表 1), 按照 2×High Fidelity Master Mix (I5 HM-OEM, 北京擎科) 说明书进行 PCR 扩增。PCR 产物用 1% 琼脂

糖凝胶进行电泳, 并用 DNA 纯化回收试剂盒 (DP214-02, 北京天根) 进行提纯回收。连接 pM-DTM19-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5α, 挑取阳性单克隆菌液, 送至擎科生物科技有限公司测序。

表 1 用于基因克隆和实时荧光定量的引物序列
Tab. 1 Primer sequences used for the gene cloning and qRT-PCR

引物/基因名称 primer/gene name	引物序列 (5'→3') primer sequence	用途 use
CsAGL8	F: ATGGGGAGAGGGAAGGT; R: TCAAAGCAAATAAACATACT	克隆 cloning
qCsAGL8	F: CCTACTTCAAATGGTTCAAAGGCAC; R: TGGCGGAGTATAGCATCTAATTGGT	表达 expressing
qAtFD	F: GCGCTAGGAAACAGGAATGCTTATACAAA; R: AGCTGTGGAAGACCGTTGAAGTGTG	表达 expressing
qAtFLC	F: GACTAGAGCCAAGAAGACCG; R: GAAGATTGTCGGAGATTTGT	表达 expressing
qAtCO	F: CCGGGTCTGCGAGTCATG; R: GGCATCATCTGCCTCACACA	表达 expressing
qAtFT	F: GAGACCCTCTTATAGTAAGCAGAGTTG; R: GGGAGTTCAAGTGAAAGAACCAAAGT	表达 expressing
qAtSOC1	F: GCTCTCAGTGCTTTGTGATGC; R: AAGAACGTACTTGGAGCTGGC	表达 expressing
qAtActin2	F: CTTGCACCAAGCAGCATGAA; R: CCGATCCAGACACTGTACTTCCTT	内参 internal reference
qCsGAPDH	F: GATAGTGTTACGGTCAATGGA; R: GCAGCAGCCTTATCCTTATCAG	内参 internal reference

1.3 *CsAGL8* 的生物信息学分析

利用 DNAMAN 10.0 预测基因编码的氨基酸序列; 利用 ExPasy-protparam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析编码蛋白质的理化性质; 利用 ExPASy-ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 预测疏水性/亲水性; 利用 TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测蛋白跨膜区; 利用 SignalP-6.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测蛋白信号肽; 利用 SoftBerry ProtComp (<https://www.softberry.com/berry.phtml>) 预测亚细胞定位; 利用 ExPASy-PROSITE (<https://prosite.expasy.org/>) 和 NCBI 的 CDD 保守域数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 预测蛋白质结构域; 利用 SOPMA (<https://npsa-prabi.ibcp.fr/cg>) 预测蛋白质的二级结构; 利用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 预测蛋白质的三维立体结构。

从茶树基因组数据库 TeaPGDB V1.0^[20](<http://eplant.njau.edu.cn/tea/>) 下载黄旦 (HD)、龙井 43 (LJ43)、野生大毫 (DASZ) 和舒茶早 (SCZ) 等茶树品种或资源的 CDS、GFF 和 Genome 序列, 从 TAIR 数据库 (<https://www.arabidopsis.org/>) 下载拟南芥的相关序列, 利用 TBtools 提取 *CsAGL8* 在不同茶树品种中的 cDNA 和基因序列; 通过本地 BLAST, 再利用 DNAMAN 10.0 进行序列比对和多态性分析; 利用 MEME (<http://meme-suite.org/>)

预测保守基序; 利用 PlantCARE (<http://web-tools.plantcare/html/>) 预测启动子顺式元件; 按照序列相似程度, 选取 18 个其他物种的 AGL、SVP 以及 FLC 等 II 型 MADs-box 蛋白, 利用 MEGA 11.0 以邻接法 (Bootstrap 设为 1 000) 构建系统发育树。

1.4 *CsAGL8* 的表达分析

分别提取茶树 EW 和 CC2 在不同越冬期和不同组织中的 RNA 样品, 反转录为 cDNA, 采用 qRT-PCR 检测 *CsAGL8* 在不同样品中的表达量。操作方法按照 2×M5 HiPer SYBR Premix EsTaq plus (with Tli RNaseH) 试剂盒说明书进行, 荧光定量引物见表 1。每个样品设置 3 个重复。使用 2^{-ΔΔCt} 法计算相对表达水平。

1.5 表达载体的构建及农杆菌介导的拟南芥转化
将 *CsAGL8* 的 CDS 与载体连接转化大肠杆菌, 筛选鉴定并测序, 获得重组质粒。将构建的过表达载体 (35S: *CsAGL8*-pCAMBIA1302) 转化农杆菌 EHA105, PCR 鉴定后获得阳性农杆菌。采用农杆菌介导的花序浸染法进行拟南芥的转化。

1.6 转基因植株表型观测及开花相关基因的分析
对筛选得到的 T₃ 代转基因阳性株系进行表型分析。筛选出与拟南芥开花相关的 *FLC*、*SOC*、*FT*、*CO* 和 *FD* 等基因^[21], 采用 qRT-PCR 对野生型和转基因植株进行检测。引物见表 1, 方法同 1.4 节。

2 结果与分析

2.1 *CsAGL8* 的克隆及序列

以 EW 休眠顶芽为模板, PCR 扩增后获得 1 条约 800 bp 的电泳条带 (图 1a)。测序分析结果表明该基因的 CDS 序列长度为 720 bp, 编码 239 个氨基酸 (图 1b), 命名为 *CsAGL8*。

CsAGL8 蛋白分子式为 $C_{1177}H_{1912}N_{354}O_{377}S_{13}$, 理论分子质量为 27.47 ku, 等电点为 6.67。富含谷氨酰胺 (Gln, 9.6%)、亮氨酸 (Leu, 9.6%) 和谷氨酸 (Glu, 9.2%); 正电荷残基 (Arg+Lys) 34 个, 负电荷残基 (Asp+Glu) 35 个。脂肪系数为 74.64, 不稳定指数为 48.30, 总平均亲水性值为 -0.805, 是亲水不稳定蛋白。TMHMM Server v.2.0 推测该

蛋白不是跨膜蛋白。SignalP-6.0 预测显示该蛋白质不存在信号肽, 不是分泌蛋白。亚细胞定位预测该蛋白可能位于细胞核中。

CsAGL8 蛋白的二级结构主要由 α 螺旋 (54.39%)、无规则卷曲 (26.78%) 和 β 折叠 (4.18%) 构成。预测该蛋白三维立体结构 (图 1c), 以拟南芥 MADS 结构域转录因子 SEPALLATA 3 为模板^[22], 与二级结构预测相符。ExPASy-PROSITE 保守结构域预测显示: *CsAGL8* 包含 2 个结构域, 分别为位于 1~61 位的 MAD-BOX 2 (PS50066) 和位于 86~176 位的 K-BOX (PS51297), NCBI 的 CDD 保守域预测结果 (图 1d) 也显示在 1~154 位包含 MADS-MEF 2 结构域和 K-box 结构域。

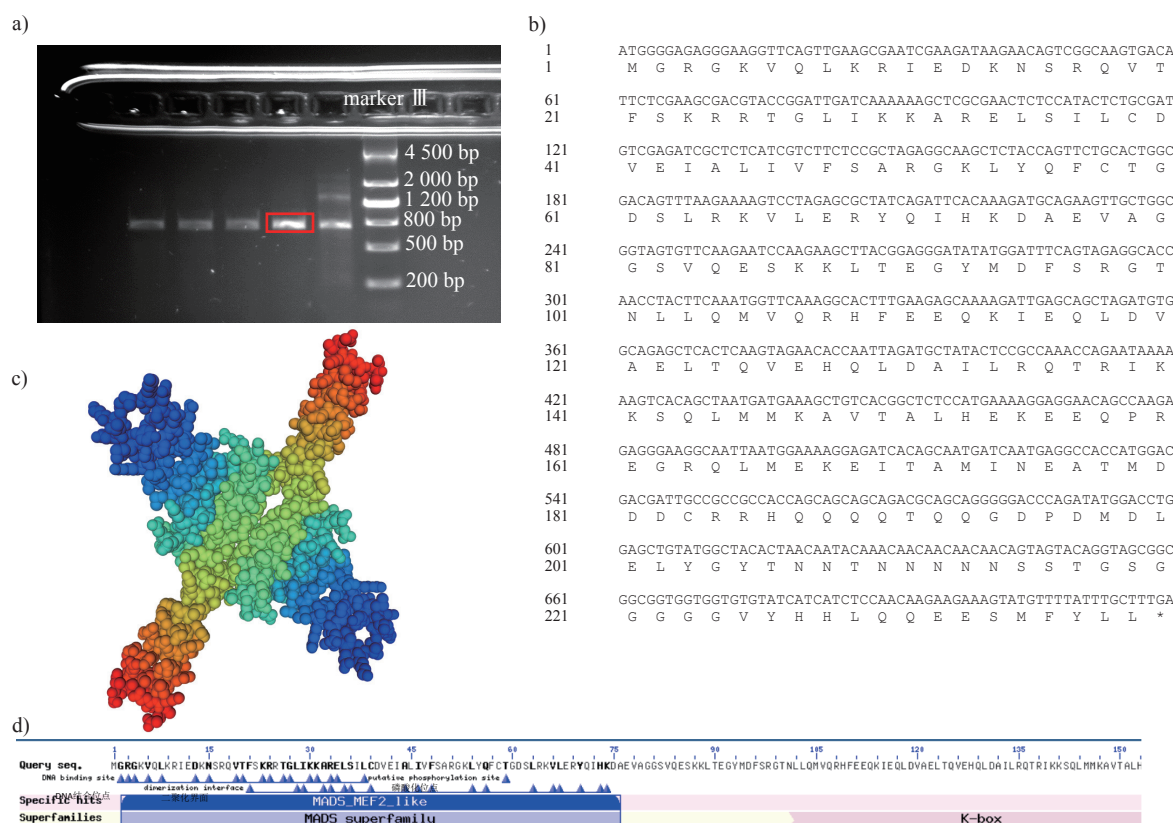


图 1 *CsAGL8* 的克隆 (a)、氨基酸序列 (b)、三级结构和 CDD 保守域 (d)

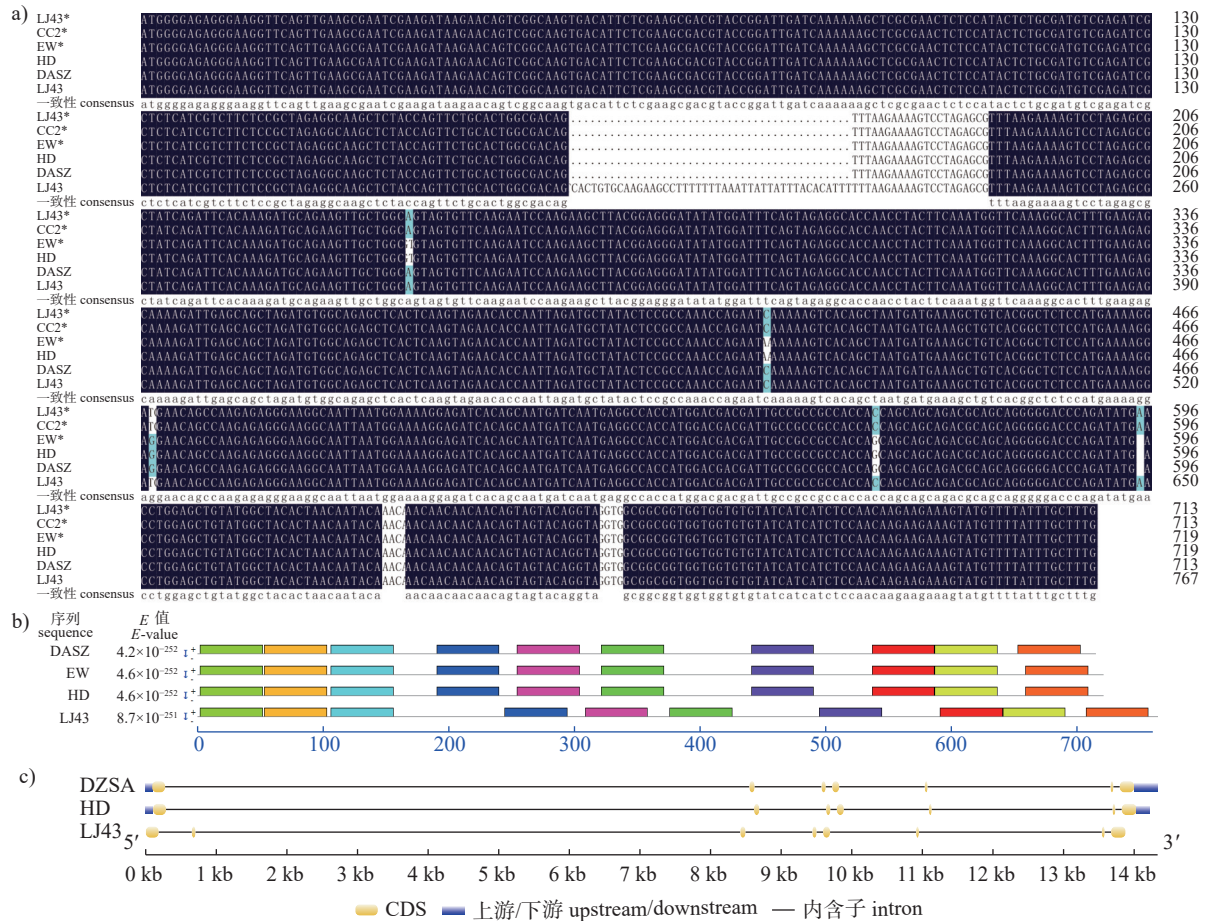
Fig. 1 Gene cloning (a), amino acid sequence (b), tertiary structure (c) and conserved domain of CDD (d) of *CsAGL8*

2.2 *CsAGL8* 基因在不同茶树品种间的多态性

EW 的 *CsAGL8* 基因序列与茶树品种 HD、DASZ 和 LJ43 的 CDS 文库有高度相似序列, 其中与 HD 的 GWHTAZTZ003949 序列完全一致; 与 DASZ 的 GWHTABKB017500 一致性高达 98.89%; 与 LJ43 的 GWHTACFB015156 一致性为 91.60%,

变异主要为 LJ43 在 187~240 位增加了 54 bp 的序列。同时克隆得到 LJ43 和 CC2 序列的 *CsAGL8* 序列, 它们与 EW 的序列一致性高达 98.94%, 仅存在 5 个单碱基替换和 2 个三碱基缺失 (图 2a)。

不同茶树品种的 *CsAGL8* 共具有 10 个保守基序, 分布于整个序列的不同位点 (图 2b); 不



注: a) 不同品种的 cDNA 序列对比, “*”表示从对应茶树品种中克隆得到的 *CsAGL8* 序列, 无“*”则表示从数据库下载的序列; b) 保守基序分析; c) 基因结构图。

Note: a) comparison of cDNA sequences of *CsAGL8* gene in different cultivar, “*” indicates the *CsAGL8* sequence cloned from the corresponding tea varieties; no “*” indicates the sequence downloaded from the database; b) conserved motif analysis; c) gene structure.

图 2 *CsAGL8* 的多态性和基因结构分析

Fig. 2 Polymorphism and gene structure analysis of *CsAGL8*

同品种的保守基序分布情况相对保守, 变化程度较小。根据 4 个茶树品种的 *CsAGL8* 全长序列, 绘制基因结构, 结果(图 2c)显示: *CsAGL8* 基因在茶树品种 DASZ、HD 和 LJ43 上的外显子数量为 7~8, 内含子数量为 6~7, 基因全长、外显子和内含子的位置均呈一定的多态性。

2.3 不同物种同源性与系统进化

经比对, *CsAGL8* 与拟南芥 *AtAGL8* (AT5G-60910.1) 的相似度最高 (32%)。系统发育树(图 3)显示: 不同植物来源的 *MADs-box* 基因在氨基酸组成上存在不同程度的差异, 但在 1~75 位氨基酸上相对保守。EW 的 *CsAGL8* 基因与茶树 SCZ 的 CAULIFLOWER-like 蛋白 (XP_028107381.1)、印度茶树品种 Teenali 的 *MADs-box* 蛋白 (AFO10-123.1) 等聚在同一分支; 与已报道茶树 LJ43 的

CsMADs-box1、*CsMADs-box2* 以及黄金芽的 *CsDAM2* 相似度为 23%~24%; 与中华猕猴桃 *AGL* 蛋白 (PSS30323.1)、松下兰 *FLC* 蛋白 (AQM52294.1、AQM52293.1)、杜鹃 (KAF7129901.1、KAF71358-24.1)、常绿叶菊 (KAH7852335.1) 等 *MADs-box* 蛋白的相似度均高于 65%。

2.4 启动子顺式作用元件

提取起始密码子前 2 000 bp 序列进行启动子顺式元件功能分析, 结果(图 4)显示: *CsAGL8* 的启动子区含有光响应、激素响应和胁迫响应等相关元件。光响应元件主要是 Box 4、G-box、TCT-motif、Sp1、TCCC-motif 和 GATA-motif 等; 激素响应元件为 ABRE (脱落酸响应)、CGTCA-motif 和 TGACG-motif (茉莉酸甲酯响应)、TGA-element (生长素响应) 及 TCA-element (水杨酸响

应)等; 胁迫响应元件则包含 ARE (厌氧诱导)、MBS (干旱诱导)、LTR (低温响应) 和 CCAAT-box (MYB 结合位点) 等。

2.5 *CsAGL8* 的表达特性

2.5.1 *CsAGL8* 在不同组织的表达特性

qRT-PCR 结果 (图 5) 表明: *CsAGL8* 在 EW 和 CC2 各组织中均有表达, 顶芽中的表达水平显著高于其他组织部位; 在 EW 和 CC2 的花苞以及和 CC2 的花中表达量最低。

2.5.2 *CsAGL8* 在茶树越冬过程中的表达特性

不同越冬时期, *CsAGL8* 在 EW 叶片中的相对表达量呈先升高后降低的趋势, 于 1 月 8 日达

到最大值; 在 CC2 叶片中则呈升高—降低—升高—降低的趋势 (图 6a)。在整个越冬期间, EW 芽的 *CsAGL8* 相对表达量明显低于 CC2, 一直维持在相对较低的水平, 且表达量下降的时间比 CC2 早约 15 d (图 6b)。

2.5.3 在拟南芥中异源过表达后的功能

由图 7 可知: 2 个过表达 *CsAGL8* 的转基因株系提前开花 10~15 d。转基因拟南芥中 *FT* 的相对表达量显著低于野生型, *SOC* 的表达量无差异, 其余拟南芥开花相关基因的相对表达量无明显变化规律。

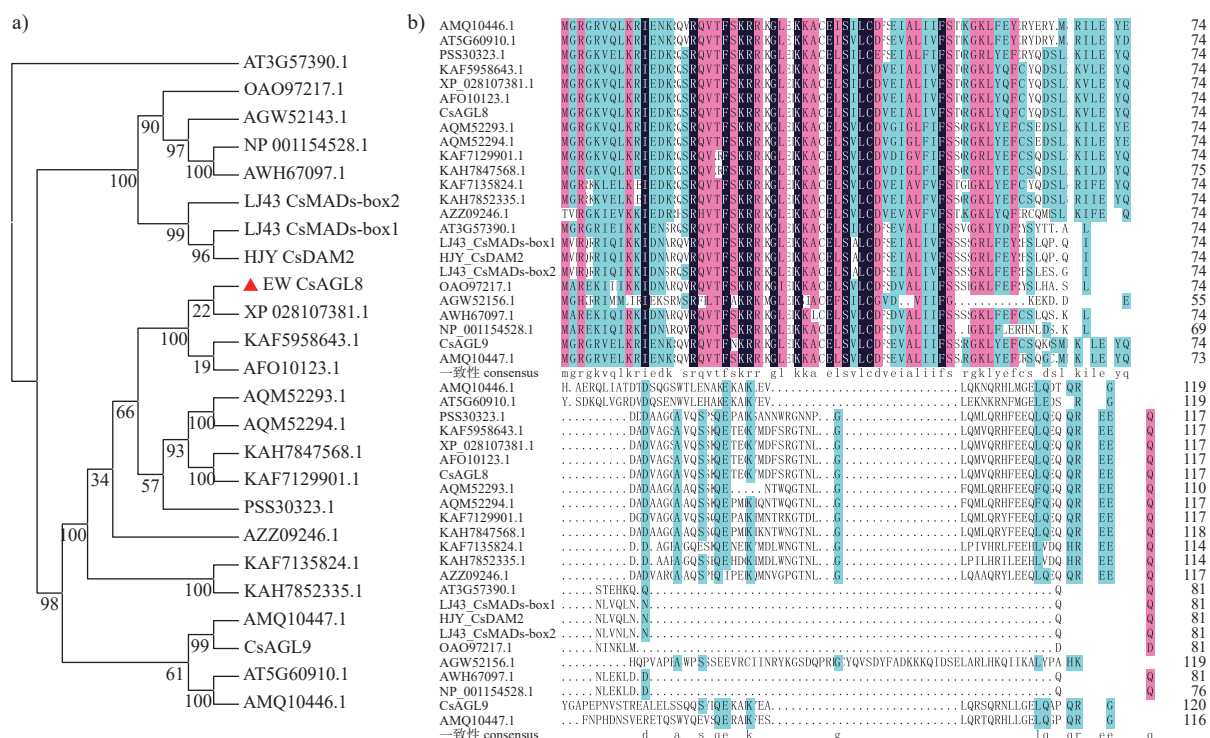


图 3 *CsAGL8* 在不同植物的系统进化分析 (a) 与同源氨基酸序列对比 (b)

Fig. 3 Phylogenetic analysis (a) and homologous amino acid sequence alignment (b) of *CsAGL8* in different plants

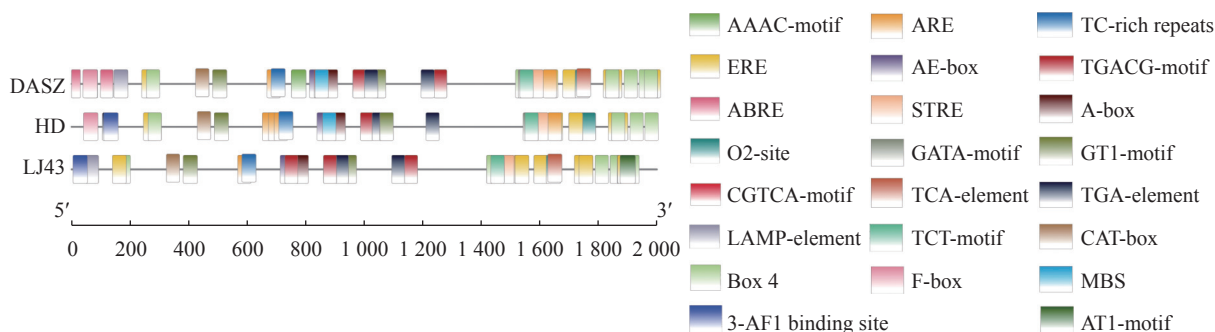
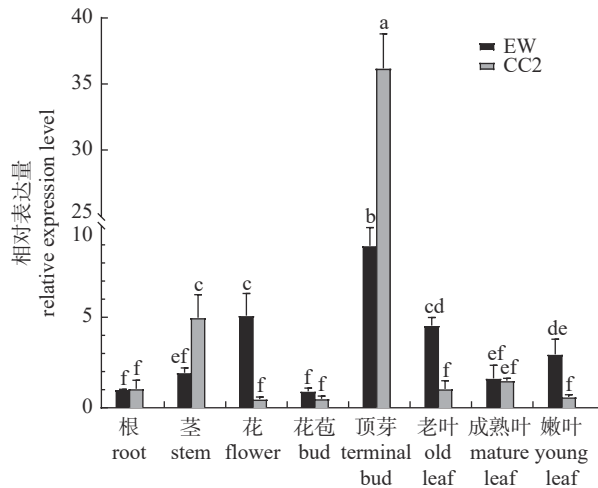


图 4 *CsAGL8* 基因启动子顺式元件结构

Fig. 4 *CsAGL8* gene promoter *cis*-element structure



注: 不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$); 下同。

Note: Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$); the same as below.

图 5 EW 和 CC2 中 *CsAGL8* 基因的组织特异性表达

Fig. 5 Tissue special expression of the *CsAGL8* gene in EW and CC2

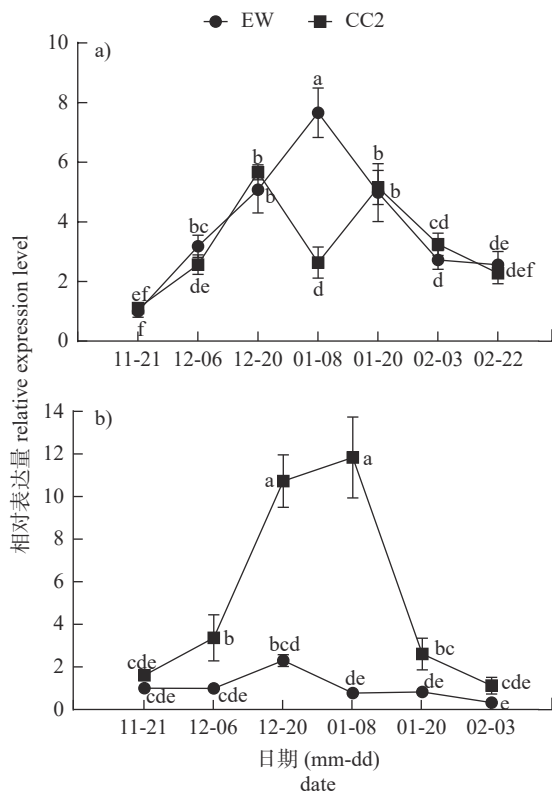


图 6 *CsAGL8* 基因在茶树叶 (a) 和芽 (b) 越冬过程中的表达

Fig. 6 Expression of *CsAGL8* gene during overwintering of tea plant leaves (a) and buds (b)

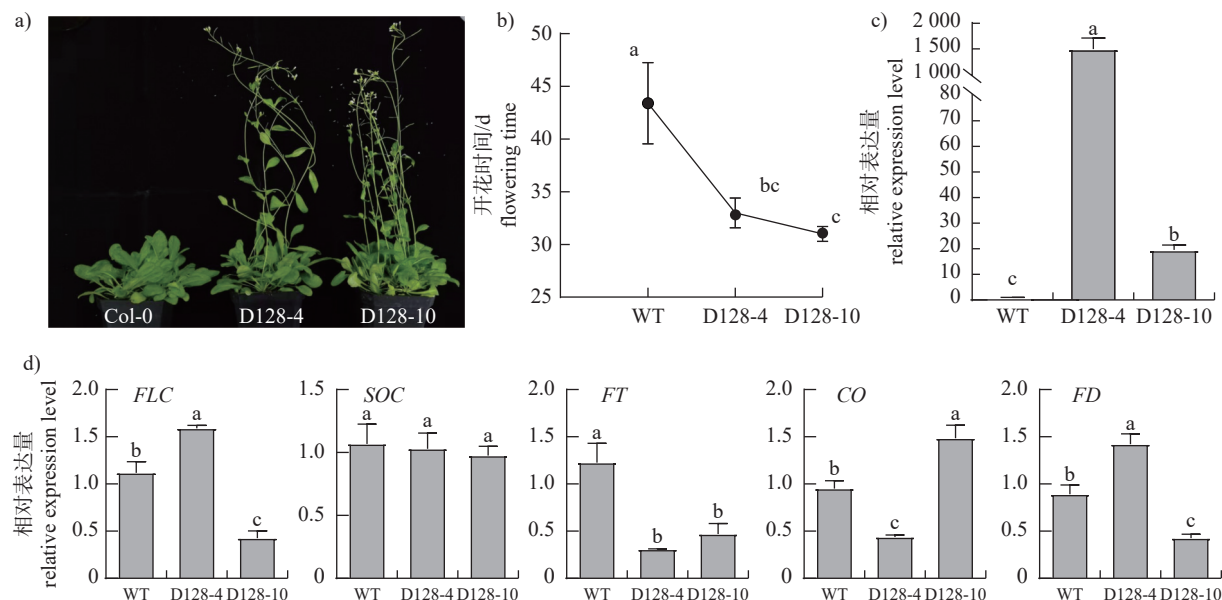
3 讨论

MADS-box 转录因子在植物生长发育和休眠调控中发挥着重要作用^[23]。本研究从茶树 EW 休

眠芽中克隆得到 1 个新的 *MADS-box* 转录因子基因 *CsAGL8*, 它与已报道可能调控茶树冬季休眠的同一家族转录因子 *CsMADS-box1*、*CsMADS-box2* 和 *CsDAM2* 的相似度仅为 23%~24%^[24-26]。基于已发布的多个茶树全基因组测序和注释结果, 茶树品种 DASZ、HD 和 LJ43 中均有与 *CsAGL8* 高度相似的 CDS 序列, 应为同一基因位点。序列比对在 *CsAGL8* 的编码区共检测到 8 个变异位点, 包括 5 个单碱基替换、2 个三碱基缺失和 1 个长片段插入, 这些多态性可能会引起 *CsAGL8* 的功能差异, 使茶树形成表型差异^[26]。

MADS-box 家族基因作为芽休眠调控的核心基因, 受光周期、温度和激素等调控, 能通过抑制 *FT* 或类似基因推迟萌芽, 抑制分生组织生长^[9], 如: *MdDAMa* 和 *MdDAMc* 调控苹果秋季停止生长, *MdDAMb* 维持芽休眠; 过表达日本杏 *PmDAM6* 能推迟转基因苹果的芽萌发并减少其侧枝生长等^[7-11]; 郝心愿^[24]从茶树 LJ43 中克隆得到 *CsMADS-box1* 和 *CsMADS-box2* 基因, 在杨树中过表达发现 *CsMADS-box1* 通过光周期和温度信号通路在休眠及生长调控中发挥重要作用。本课题组在 EW 中发现 *CsAGL8* 与 *CsMADS-box1* 基因有相同的组织表达特性^[15], 证实 *CsAGL8* 可能参与茶树芽生育的调控。对多种植物的季节性表达分析发现: 与休眠相关的 *MADS-box* 基因在生理休眠期表达量升高, 在生态休眠期和休眠解除时表达量降低^[11, 27-30]。本研究表明: *CsAGL8* 在茶树越冬过程中的表达变化呈现与休眠相关 *MADS-box* 基因相同的趋势, 在休眠形成和生理休眠阶段的表达量显著上升, 而在休眠解除阶段下调。在整个越冬期间, 特早生茶树 EW 芽中的 *CsAGL8* 表达量都低于 CC2, 且下调时间早于 CC2, 符合 EW 冬季休眠时间短的特性。这说明 *CsAGL8* 是调控茶树冬季芽休眠的相关基因, 但其调控的信号途径及调控网络还需进一步研究。

AGL8 参与拟南芥的开花进程, 调控芽顶端分生组织向花序分生组织的转变, 并与 *SOC1* 和 *FT* 共同表达诱导花器官发育, 从而调控开花时间^[31], 前人对拟南芥中过表达桃树的 *AGL8* 同源基因研究^[14]也得到了类似结果。本研究发现: 过表达 *CsAGL8* 的拟南芥开花时间可提前 10~15 d, 说明 *CsAGL8* 作为 *AGL8* 的同源基因同样具有促进开花的作用。拟南芥的开花性状与多年生植物



注: a) 野生型 (Col-0, WT) 和转基因型 (D128-4 和 D128-10) 拟南芥种植 35 d 后的表型; b) 开花时间分析; c) *CsAGL8* 的表达量; d) 转基因植株及对照开花相关基因的表达水平。

Note: a) phenotype of wild-type (Col-0, WT) and transgenic *Arabidopsis* (D128-4 和 D128-10) on the 35 days; b) analysis of flowering days; c) expression level of *CsAGL8*; d) expression level of flowering-related genes in transgenic plants and the wild-type control.

图 7 *CsAGL8* 异源转化拟南芥表达分析

Fig. 7 Overexpression analysis of *CsAGL8* in *Arabidopsis*

的芽休眠调控共享部分调控通路^[3], 异源表达结果也在一定程度上间接表明 *CsAGL8* 参与茶树的休眠调控。后续课题组将研究 *CsAGL8* 的下游转录调控位点和靶基因, 以进一步证实 *CsAGL8* 参与茶树的休眠调控, 并了解其作用机制。

4 结论

本研究成功克隆得到 1 个新的茶树 *MADS-box* 转录因子基因 *CsAGL8* 的编码区序列, 该序列与拟南芥 *AtAGL8* (AT5G60910.1) 的相似度最高。越冬期间, *CsAGL8* 基因的表达量呈先升高后降低的趋势, 且在休眠顶芽中的表达量显著高于其他组织; 该基因在特早生茶树品种峨眉问春芽中的表达量显著低于对照品种川茶 2 号, 且下调时间也早于对照品种。过表达 *CsAGL8* 的拟南芥转基因植株早花 10~15 d。推测该基因可能调控茶树越冬芽的生长休眠进程。

[参考文献]

[1] ZHANG Z Y, ZHUO X K, ZHAO K, et al. Transcriptome profiles reveal the crucial roles of hormone and sugar in the bud dormancy of *Prunus mume*[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 5090. DOI: 10.1038/s41598-018-23108-9.

[2] LLORET A, BADENES M L, RIOS G. Modulation of dormancy and growth responses in reproductive buds of temperate trees[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9(13): 1368. DOI: 10.3389/fpls.2018.01368.

[3] FALAVIGNA V D S, GUITTON B, COSTES E, et al. I want to (bud) break free: the potential role of *DAM* and *SVP-like* genes in regulating dormancy cycle in temperate fruit trees[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 1990. DOI: 10.3389/fpls.2018.01990.

[4] QUESADA-TRAVER C, GUERRERO B I, BADENES M L, et al. Structure and expression of bud dormancy-associated *MADS-box* genes (*DAM*) in European plum[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11(19): 1288. DOI: 10.3389/fpls.2020.01288.

[5] 上官凌飞, 王子诚, 方项, 等. *DAM* 基因调控多年生果树芽休眠的机制[J]. 南京农业大学学报, 2020, 43(5): 790. DOI: 10.7685/jnau.201912069.

[6] BIELENBERG D G, WANG Y E, LI Z G, et al. Sequencing and annotation of the evergrowing locus in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] reveals a cluster of six *MADS-box* transcription factors as candidate genes for regulation of terminal bud formation[J]. Tree Genetics & Genomes, 2008, 4(3): 495. DOI: 10.1007/s11295-007-0126-9.

[7] YAMANE H, OOKA T, JOTATSU H, et al. Expressional regulation of *PpDAM5* and *PpDAM6*, peach (*Prunus persica*) dormancy-associated *MADS-box* genes, by low temperature and dormancy-breaking reagent treatment[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(10): 3481. DOI: 10.1093/jxb/err028.

- [8] 李亮, 刘杭, 张桂池, 等. 不同低温需求量砂梨休眠相关基因 *PpMADS13* 的特征及表达模式[J]. 亚热带植物科学, 2016, 45(1): 42. DOI: [10.3969/j.issn.1009-7791.2016.01.009](#).
- [9] PORTO D D, FALAVIGNA V D S, ARENHART R A, et al. Structural genomics and transcriptional characterization of the dormancy-associated MADS-box genes during bud dormancy progression in apple[J]. Tree Genetics & Genomes, 2016, 12(3): 46. DOI: [10.1007/s11295-016-1001-3](#).
- [10] WU R M, WANG T C, WARREN B A W, et al. Kiwifruit *SVP2* gene prevents premature budbreak during dormancy[J]. Journal of Experimental Botany, 2017, 68(5): 1071. DOI: [10.1093/jxb/erx014](#).
- [11] WU R M, TOMES S, KARUNAIRETNAM S, et al. *SVP*-like *MADS-box* genes control dormancy and budbreak in apple[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 477. DOI: [10.3389/fpls.2017.00477](#).
- [12] 吴凡, 徐勇, 常凤启, 等. 桃中两个 *MADS-box* 基因的克隆与表达分析[J]. 遗传学报, 2004, 31(9): 908.
- [13] 褚婷婷, 谢华, 徐勇, 等. 植物 *MADS-box* 基因 *FRUIT-FULL (FUL)* 研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(9): 98. DOI: [10.13523/j.cb.20100917](#).
- [14] 徐勇, 张林, 马荣才. 桃 (*Prunus persica*) 中两个 *MADS-box* 基因功能的初步鉴定和遗传作图[J]. 科学通报, 2008, 53(5): 537. DOI: [10.3321/j.issn:0023-074X.2008.05.008](#).
- [15] 刘媛媛, 陆婉瑶, 刘双, 等. 大豆 *GmAGL8* 基因功能在拟南芥中的初步鉴定[J]. 北京农学院学报, 2020, 5(4): 20. DOI: [10.13473/j.cnki.issn.1002-3186.2020.0404](#).
- [16] TAN L Q, WANG L B, ZHOU B, et al. Comparative transcriptional analysis revealed genes related to short winter-dormancy regulation in *Camellia sinensis*[J]. Plant Growth Regulation, 2020, 92(2): 401. DOI: [10.1007/s10725-020-00649-6](#).
- [17] 谢文钢, 陈玮, 谭礼强, 等. 四川3个特色茶树品种芽叶性状及光合特性分析[J]. 茶叶科学, 2021, 41(6): 815. DOI: [10.13305/j.cnki.jts.2021.06.006](#).
- [18] 王留彬, 周斌, 刘琴玲, 等. 特早生型茶树新品种及配套栽培技术[J]. 四川农业科技, 2020(2): 23. DOI: [10.3969/j.issn.1004-1028.2020.02.011](#).
- [19] 黄亮, 唐茜, 李慧, 等. 高氨基酸茶树新品种川茶2号主要生化成分及绿茶适制性研究[J]. 西南农业学报, 2017, 30(3): 560. DOI: [10.16213/j.cnki.scjas.2017.3.013](#).
- [20] LEI X G, WANG Y, ZHOU Y H, et al. TeaPGDB: tea plant genome database[J]. Beverage Plant Research, 2021, 1(1): 30. DOI: [10.48130/BPR-2021-0005](#).
- [21] 张友润. 氮素营养调控拟南芥开花诱导相关基因表达的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
- [22] PURANIK S, ACAJJAOU S, CONN S, et al. Structural basis for the oligomerization of the MADS domain transcription factor SEPALLATA3 in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2014, 26(9): 3603. DOI: [10.1105/tpc.114.127910](#).
- [23] 张伟富, 郝心愿, 杨亚军, 等. *DAM* 基因在植物芽休眠调控中的研究进展[J]. 植物生理学报, 2019, 55(8): 1047. DOI: [10.13592/j.cnki.ppj.2019.0118](#).
- [24] 郝心愿. 茶树越冬芽休眠的分子机理研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- [25] 丰金玉. 黄金茶 *CsDAM2* 基因克隆及功能分析[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2016.
- [26] 张伟富. 茶树品种的芽休眠与 *CsDAM* 基因表达的相关性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2020.
- [27] LI Z G, REIGHARD G L, ABBOTT A G, et al. Dormancy-associated MADS genes from the EVG locus of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] have distinct seasonal and photoperiodic expression patterns[J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60(12): 3521. DOI: [10.1093/jxb/erp195](#).
- [28] SASAKI R, YAMANE H, OOKA T, et al. Functional and expressional analyses of *PmDAM* genes associated with endodormancy in Japanese apricot[J]. Plant Physiology, 2011, 157(1): 485. DOI: [10.1104/pp.111.181982](#).
- [29] JIMENEZ S, REIGHARD G L, BIELENBERG D G. Gene expression of *DAM5* and *DAM6* is suppressed by chilling temperatures and inversely correlated with bud break rate[J]. Plant Molecular Biology, 2010, 73(1/2): 157. DOI: [10.1007/s11103-010-9608-5](#).
- [30] ROTHKEGEL K, SANCHEZ E, MONTES C, et al. DNA methylation and small interference RNAs participate in the regulation of *MADS-box* genes involved in dormancy in sweet cherry (*Prunus avium* L.)[J]. Tree Physiology, 2017, 37(12): 1739. DOI: [10.1093/treephys/tpx055](#).
- [31] 徐双双, 安玉兰, 温梦梅, 等. 黄瓜 *CsMADS08* 及其下游调控基因的功能与表达分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2022, 50(2): 115. DOI: [10.13207/j.cnki.jnwafu.2022.02.013](#).

责任编辑: 何承刚