



茶树异胡豆苷合成酶基因的全基因组鉴定和表达分析

周棋赢, 姜慧敏, 李拉拉, 袁红雨, 张瑞娇, 王仪佳

引用本文:

周棋赢, 姜慧敏, 李拉拉, 袁红雨, 张瑞娇, 王仪佳. 茶树异胡豆苷合成酶基因的全基因组鉴定和表达分析[J]. 信阳师范学院学报自然科学版, 2021, 34(4): 596–605. doi: 10.3969/j.issn.1003–0972.2021.04.015

ZHOU Qiying, JIANG Huimin, LI Lala, YUAN Hongyu, ZHANG Ruijiao, WANG Yijia. Genome-wide Identification and Expression Analysis of Strictosidine Synthase Gene in Tea Plant[J]. *Journal of Xinyang Normal University (Natural Science Edition)*, 2021, 34(4): 596–605. doi: 10.3969/j.issn.1003–0972.2021.04.015

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.3969/j.issn.1003–0972.2021.04.015>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

茶树NAC基因的鉴定及其在逆境反应中的表达调控分析

Genome-wide Identification of *NAC* Genes in Tea Plant and Its Expression Regulation in Stress Response

信阳师范学院学报自然科学版, 2020, 33(4): 567–578. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1003–0972.2020.04.010>

大豆BGLU基因家族全基因组鉴定与表达分析

Genome-wide Identification and Expression Analysis of BGLU Family Genes in Soybean

信阳师范学院学报自然科学版, 2019, 32(3): 372–378. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1003–0972.2019.03.006>

大豆bHLH转录因子家族成员的进化及功能分化研究

Evolution and Function Divergence Analysis of the bHLH Transcription Factor Family in Soybean(*Glycine max* L.)

信阳师范学院学报自然科学版, 2019, 32(1): 27–38. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1003–0972.2019.01.006>

茉莉酸对水稻根系生长素合成及运输的调控

Research of Jasmonic acid Modulated Auxin Biosynthesis and Transport in Rice Root

信阳师范学院学报自然科学版, 2021, 34(3): 448–451. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1003–0972.2021.03.017>

茶树基因组研究进展

Advances in Genome Research of Tea Plant

信阳师范学院学报自然科学版, 2021, 34(4): 606–613. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1003–0972.2021.04.016>

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0972.2021.04.015

文章编号: 1003-0972(2021)04-0596-10

茶树异胡豆苷合成酶基因的全基因组 鉴定和表达分析

周棋赢^{a*}, 姜慧敏^a, 李拉拉^b, 袁红雨^a, 张瑞娇^a, 王仪佳^a

(信阳师范学院 a.生命科学学院/河南省茶树生物学重点实验室/河南省茶叶精深加工工程技术研究中心/
大别山农业生物资源保护与利用研究院; b.国际教育学院, 河南 信阳 464000)

摘要: 基于隐马可夫模型检索和序列比对, 从茶树基因组鉴定出 17 个异胡豆苷合成酶 (Strictosidine synthase, STR) 基因 (*CsSTR1*~*17*)。理化分析表明, *CsSTR* 蛋白长度在 147~552 个氨基酸之间, 分子量介于 15.6~60.8 kD, 等电点介于 4.65~10.88, 除 *CsSTR3*, 4, 9, 10, 11 和 13, 其他 *CsSTR* 都为亲水性蛋白。物种进化分析结果表明, *CsSTR3*, 4, 10, 11, 12, 13, 14 与蛇根木、萝芙木、长春花和喜树中的 STR 位于同一进化分支; 但进化关系较近的 *CsSTR* 基因间, 其内含子数目和长度、蛋白保守基序的数量和类型不同。表达分析结果显示, *CsSTR* 基因表达受低温、干旱、盐胁迫以及茉莉酸甲酯调控, 大部分 *CsSTR* 基因在顶芽、成熟叶和根中具有较高的表达量。启动子分析结果表明, *CsSTR* 基因启动子区含有许多与生长发育和逆境反应相关的元件。ERF、MYB、Zinc Finger、bZIP 家族转录因子是与 *CsSTR* 基因启动子结合较多的蛋白。

关键词: 茶树; 异胡豆苷合成酶; 鉴定; 表达分析

中图分类号: Q601 文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Genome-wide Identification and Expression Analysis of Strictosidine Synthase Gene in Tea Plant

ZHOU Qiying^{a*}, JIANG Huimin^a, LI Lala^b, YUAN Hongyu^a, ZHANG Ruijiao^a, WANG Yijia^a

(a.College of Life Sciences/Henan Key Laboratory of Tea Plant Biology/Henan Engineering Research Center of
Tea Deep-processing/Institute for Conservation and Utilization of Agro-bioresources in Dabie Mountains;

b.College of International Education, Xinyang Normal University, Xinyang 464000, China)

Abstract: Based on the Hidden-Markov model searching and sequence alignment, 17 STRs (*CsSTR1*~*17*) were identified from the tea plant genome. Physicochemical analysis showed that *CsSTR* proteins was 147 to 552 amino acids in length, with molecular weight from 15.6 to 60.8 kD, and isoelectric point from 4.65 to 10.88. Except *CsSTR3*, 4, 9, 10, 11 and 13, the other *CsSTR* proteins were hydrophilic. Phylogenetic analysis showed that *CsSTR3*, 4, 10, 11, 12, 13, 14 were located in the same evolutionary branch as the STRs from *Rauvolfia serpentine*, *Rauvolfia verticillata*, *Catharanthus roseus* and *Camptotheca acuminata*, respectively. However, the number and length of *CsSTR* gene introns and the number and conserved *CsSTR* protein motifs were different among *CsSTR* genes with close evolutionary relationship. Expression analysis showed that *CsSTR* gene expression was regulated by low temperature, drought and salt stresses and methyl jasmonate, most *CsSTR* genes were highly expressed in apical bud, mature leaf and root. *Cis*-elements related to growth, development and stress response were abundant in the promoter regions of *CsSTR* genes. ERF, MYB, Zinc Finger, and bZIP transcription factors were protein families which had lots of binding sites in the *CsSTR* gene promoters.

Key words: *Camellia sinensis*; STR; identification; expression analysis

收稿日期: 2020-06-10; 修订日期: 2021-07-25; * 通信联系人, E-mail: zhouqy@xynu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目(U1404319); 河南省科技计划项目(202102110230, 212102110399, 182102110449); 安徽省研究人员
科研基金项目(2017B190); 南湖青年学者奖励计划项目(2016060); 信阳师范学院大学生科研基金项目(2019-DXS-088, 2020-
DXSDXSDXS-147)

作者简介: 周棋赢(1984—), 男, 河南商城人, 讲师, 博士, 主要从事茶树优质基因的挖掘与利用研究。

0 引言

萜类吲哚生物碱(Terpenoid indole alkaloids, TIAs)是一大类有着重要药用价值的生物碱,具有显著的抗肿瘤、降血压、降血糖和抗心律失常等活性^[1-2].异胡豆苷合成酶(Strictosidine synthase, STR)催化裂环马钱子苷和色胺发生立体选择性的Pictet-Spengler缩合反应,生成TIAs合成的通用前体——异胡豆苷,异胡豆苷再在各种酶的参与下转化为各种TIAs^[1-2].因此,STR位于吲哚类生物碱合成途径的咽喉位置,是TIAs代谢工程中常用的候选基因和作用靶点^[2-3].转化STR基因的长春花细胞中TIAs的积累增加了约65倍^[2,4].过量表达长春花STR基因使烟草中STR的活性比长春花中STR的活性提高了3~22倍^[5-6].

20世纪70年代末,人们最早从夹竹桃科植物长春花中分离到了异胡豆苷合成酶STR^[7].20世纪80年代初,利用分子生物学技术,STR基因的cDNA序列首次从蛇根木(*Rauvolfia serpentina*)悬浮细胞中得到克隆,命名为STR1.STR1编码344个氨基酸,分子量约为35.3 kDa,并通过异源表达实现了STR1蛋白在大肠杆菌中的诱导表达^[5-6].随后,人们陆续从长春花、短小蛇根草、萝芙木和日本蛇根草等植物中克隆得到了STR基因^[6,8-9].三维结构研究显示,STR1整体结构为六叶 β -螺旋桨状,每叶由4个反平行的 β 折叠片组成.在 β -螺旋桨结构中有3个 α 螺旋,其外部和内部两个 α 螺旋由Cys-89和Cys-101形成的二硫键连接,这是STR的一个普遍特征^[10].

研究还发现STR在植物的抗逆反应中有重要作用^[11-13].用PEG6000模拟干旱处理长春花叶片,发现STR基因表达量随胁迫时间的延长、胁迫强度增强而增加,进而诱导了TIAs的合成^[14].NaCl处理下,STR基因的表达量增加了近两倍^[15].低温处理引起STR的表达下调,并使TIAs的含量降低;加入CaCl₂后,STR表达上调,下游TIAs的含量也会增加^[15].用瓜果腐霉诱导子处理长春花悬浮培养细胞,会诱导STR活性的增强^[14,16].LIANG等^[17]的研究发现,黄曲霉诱导子能够诱导STR基因表达,导致TIAs在长春花形成层细胞中的积累.拟南芥STR基因SSL5、6、7能被植物防御信号SA、MeJA、ET、伤信号以及病原菌侵染诱导,暗示它们在植物的诱导防御反应中有重要作用^[18].烟草天蛾咬食长春花后,咬食叶中会积累大

量的异胡豆苷,新长出的叶中则积累了大量TIAs, TIAs在取食烟草天蛾肠道中的聚集导致其快速死亡^[13].

茶树是一种重要的经济作物,低温、干旱和高盐等逆境常影响茶树的生长发育,降低茶叶的产量和品质^[19].中国自古就有“神农尝百草,日遇七十二毒,得茶而解之”的历史记载.现代科学研究也发现,茶在保护人类健康方面具有重要作用^[20].近几年来,茶树基因组测序在不同品种中陆续完成^[21],但目前对于茶树异胡豆苷合酶(*CsSTR*)基因的研究还未见报道.因此,对茶树异胡豆苷合酶基因进行鉴定,并对其表达模式进行研究,对于利用栽培手段调控茶树TIAs的积累以及茶树的抗性育种都具有重要的指导意义.

1 材料和方法

1.1 *CsSTR* 基因的鉴定和序列分析

参考周棋赢等^[22]的方法,首先从茶树基因组数据库<http://pcsb.ahau.edu.cn:8080/CSS/>^[21]下载“舒茶早”茶树品种的基因组、蛋白质和CDS序列.然后,从Pfam网站(<https://pfam.xfam.org/>)下载STR保守结构域的隐马可夫种子文件(PF03088),利用HMMER软件(V3.2.1)检索茶树蛋白质数据库,阈值设置为0.001.同时,根据BRACHER和KUTCHAN^[23]、SUN等^[24]的报道,以蛇根木和喜树STR的蛋白质序列(Genbank登录号分别为CAA44208和AES93117)为“query sequences”,利用BlastP比对茶树蛋白质数据库,阈值设置为 $1e^{-10}$.对上述两种方法获取的STR基因的CDS序列进行分析,除去无完整编码框的STR基因.将余下STR基因编码的蛋白序列提交到SMART网站(<http://smart.embl-heidelberg.de>)对保守结构域进行再次确认,去除无STR结构域以及STR结构域长度小于90个氨基酸的序列,余下的STR蛋白即为茶树STR(*CsSTR*)家族成员.

利用ExPASy网站(<http://web.expasy.org/protparam/>)对*CsSTR*蛋白的长度、分子量、等电点和总平均亲水系数(GRAVY值)进行分析.利用pLoc-mPlant(<http://www.jci-bioinfo.cn/pLoc-mPlant/>)在线工具对*CsSTR*蛋白的亚细胞定位进行分析.

1.2 *CsSTR* 基因家族系统进化树构建

根据KIBBLE和ZOU等^[25-26]报道的数据,分

别从拟南芥基因组数据库 (<https://www.arabidopsis.org/>) 和水稻基因组数据库 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) 获取拟南芥和水稻 STR 蛋白序列,从 Genbank 数据库获取夹竹桃科植物蛇根木、萝芙木、长春花、小曼长春花,茜草科植物蛇根草以及蓝果树科植物喜树中 STR 的蛋白质序列,利用 MEGAX 软件中的 ClustalW 程序进行序列比对,采用最大似然法(ML)构建分子进化树,Bootstrap 重复设置为 1 000 次。

1.3 CsSTR 基因结构和蛋白保守结构域分析

利用 MEME 5.3.3 (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 在线工具,对 CsSTR 蛋白的保守基序进行预测分析;设定保守基序(motif)大小为默认参数,输出结构域最大数目为 15。根据“舒茶早”茶树基因组数据库中 CsSTR 基因的 DNA 序列和 mRNA 序列,对 CsSTR 基因的结构进行分析;利用 TBtools 工具^[24]进行可视化作图。

1.4 CsSTR 基因表达分析

从公共数据库分别下载茶树不同组织器官在冷驯化、聚乙二醇(PEG)模拟干旱处理、NaCl 处理、茉莉酸甲酯(MeJA)处理后的转录组数据^[21, 27-28]。以“舒茶早”茶树基因组为参考,利用 Tophat 和 Cufflink 软件对茶树基因在不同器官和上述不同处理下的表达量进行计算,以 FPKM

(Fragments Per Kilobases per Million reads)值表示。提取 CsSTR 基因在不同组织器官冷驯化、PEG 处理、NaCl 处理、MeJA 处理后的 FPKM 值,使用 TBtools 工具绘制基因表达量热图。

1.5 CsSTR 基因启动子顺式作用元件分析

从“舒茶早”茶树基因组数据库^[26]获取 CsSTR 基因起始密码上游 2 Kb 的 DNA 序列,将其作为 CsSTR 基因的启动子。利用 PlantCARE 在线工具 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)对 CsSTR 基因启动子的顺式调控元件进行分析。

1.6 CsSTR 基因转录调控分析

从茶树基因组数据库分别获取 17 个 CsSTR 基因起始密码子 ATG 上游 600 bp 核酸序列,使用 PlantRegMap (<http://plantregmap.cbi.pku.edu.cn/>)工具对与这些核酸序列结合的转录因子进行预测分析,阈值设置为 $p \leq 1e^{-5}$ 。然后利用 Cytoscape(V3.7.2)软件绘制 CsSTR 基因的转录调控网络图。

2 结果与分析

2.1 CsSTR 基因家族及其分子特征

结合 HMMER 检索和 BlastP 比对茶树蛋白库的结果,从茶树基因组数据库中共鉴定出 17 个

表 1 茶树 STR 基因的基本信息

Tab. 1 Basic information of STR genes in tea plant

基因	基因 登录号	氨基酸长 度/个	分子量/ kD	等电点	总平均 亲水性	拟南芥同源物	e 值	亚细胞 定位
CsSTR1	TEA012295.1	462	51.0	7.25	-0.062	AT3G57030.1	$6e^{-151}$	液泡
CsSTR2	TEA012303.1	162	18.1	8.49	-0.259	AT2G41290.1	$1e^{-53}$	液泡
CsSTR3	TEA022196.1	309	33.7	9.72	0.241	AT3G57030.1	$1e^{-58}$	液泡
CsSTR4	TEA022212.1	248	26.7	6.42	0.26	AT1G74020.1	$3e^{-52}$	液泡
CsSTR5	TEA007771.1	406	46.3	6.53	-0.239	AT3G59530.3	0.0	液泡
CsSTR6	TEA031115.1	166	18.7	9.64	-0.224	AT3G57030.1	$5e^{-63}$	液泡
CsSTR7	TEA023543.1	446	50.7	8.69	-0.067	AT2G41290.1	$4e^{-125}$	液泡
CsSTR8	TEA008412.1	539	60.3	5.95	-0.486	AT1G08470.1	$2e^{-158}$	液泡
CsSTR9	TEA013964.1	227	25.2	5.88	0.043	AT3G51440.1	$1e^{-36}$	液泡
CsSTR10	TEA030459.1	147	15.6	4.65	0.173	AT3G57030.1	$4e^{-40}$	液泡
CsSTR11	TEA021112.1	203	21.9	4.74	0.518	AT3G57030.1	$1e^{-22}$	液泡
CsSTR12	TEA017371.1	244	26.0	9.45	-0.093	AT3G57030.1	$1e^{-47}$	液泡
CsSTR13	TEA007193.1	233	25.5	9.14	0.018	AT1G74010.1	$4e^{-50}$	液泡
CsSTR14	TEA007196.1	305	34.3	10.88	-0.173	AT1G74010.1	$2e^{-23}$	液泡
CsSTR15	TEA003211.1	552	60.8	5.49	-0.346	AT3G51430.1	$7e^{-91}$	液泡
CsSTR16	TEA003215.1	487	55.1	4.84	-0.408	AT3G51430.2	$3e^{-128}$	液泡
CsSTR17	TEA003216.1	424	47.4	4.98	-0.11	AT3G51430.2	$1e^{-130}$	液泡

STR 基因,分别命名为 CsSTR1~CsSTR17.对其编码蛋白的特征分析结果显示(表 1),组成 CsSTR 蛋白质的氨基酸数目差异很大,长度介于 147~552 个氨基酸之间,对应蛋白的大小介于 15.6~60.8 kD;其中 CsSTR15 蛋白最长,CsSTR10 蛋白最短.蛋白质等电点分析结果显示,CsSTR 蛋白的等电点大小介于 4.65~10.88.CsSTR3、4、9、10、11 和 13 蛋白的平均亲水系数大于 0,表明这些 CsSTR 蛋白可能为疏水性蛋白;而其他 CsSTR 蛋白的平均亲水系数小于 0,表明它们可能为亲水蛋白.通过与拟南芥蛋白数据库进行序列比对分析,得到了各 CsSTR 蛋白的最高同源物,对于利用模式植物拟南芥中 STR 蛋白的研究成果来探索 CsSTR 的功能具有重要意义.亚细胞定位预测分析结果显示,CsSTR 蛋白都定位于液泡.

2.2 CsSTR 基因的系统进化

将 CsSTR 蛋白序列与夹竹桃科植物蛇根木、

蛇根草,茜草科植物长春花、小曼长春花,蓝果树科植物喜树,拟南芥,水稻中 STR 蛋白的序列进行比对,并构建了 STR 蛋白的系统进化树(结果见图 1).STR 蛋白可以分为四个类群(I~IV),蛇根木 STR 蛋白 CAA44208.1、长春花 STR 蛋白 CAA43936.1 和 CAA37671.1、萝芙木 STR 蛋白 AAY81922.1、小曼长春花 STR 蛋白 AEY82399.1、短小蛇根草 STR 蛋白 BAB47180.1、日本蛇根草 STR 蛋白 ACF21007.1 以及喜树 STR 蛋白 AES93117.1 都位于类群 I 中,CsSTR、拟南芥 STR 和水稻 STR 在类群 I~III 中都有分布,类群 IV 则由水稻 STR 组成.对于 CsSTR 蛋白而言,类群 I 中有 7 个 CsSTR 成员(CsSTR3、4、10、11、12、13、14),类群 II 中有 4 个 CsSTR 成员(CsSTR9、15、16、17),类群 III 中有 6 个 CsSTR 成员(CsSTR1、2、5、6、7、8).

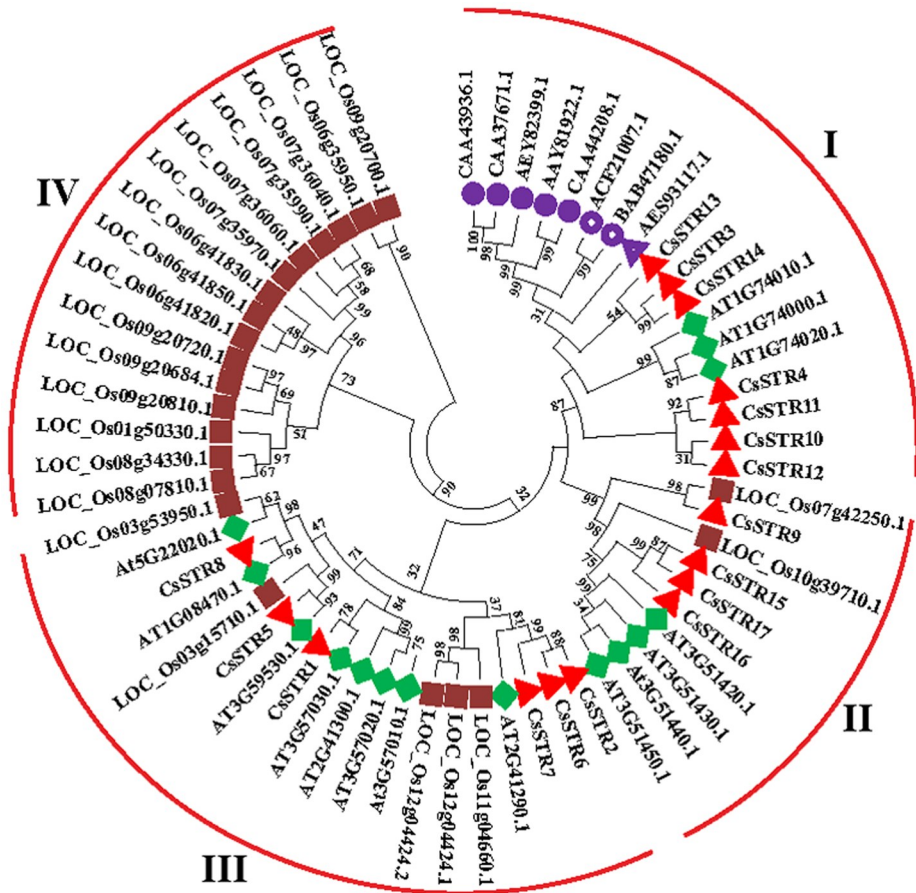


图 1 茶树 STR 蛋白与拟南芥、水稻、萝芙木、蛇根木、蛇根草、短小蛇根草、长春花以及喜树中 STR 蛋白的系统进化树

Fig. 1 The phylogenetic tree of STRs in *Camellia sinensis*, *Arabidopsis*, *Oryza sativa*, *Rauwolfia verticillata*, *Rauwolfia serpentine*, *Ophiorrhiza japonica*, *Ophiorrhiza pumila*, *Catharanthus roseus* and *Camptotheca acuminata*

2.3 *CsSTR* 基因结构和保守蛋白基序

CsSTR 基因结构分析结果显示(图 2),除了 *CsSTR8* 和 *CsSTR16* 基因含有 6 个内含子, *CsSTR1* 和 *CsSTR15* 基因含有 4 个内含子,其他 *CsSTR* 基因的内含子数目都在 1~3 之间.进化关系较近的 *CsSTR* 基因间,其内含子数目和长度也不一样,暗示它们在进化过程中经历了不同的进化

事件.蛋白保守基序的分析发现(图 2),*CsSTR* 蛋白含保守基序的数量在 4~12 个之间.进一步分析发现,除了 *CsSTR15* 和 *CsSTR17*,进化关系较近的 *CsSTR* 蛋白间其保守基序的数量和类型都不相同;但进化关系较近的 *CsSTR* 蛋白间保守基序出现的先后顺序基本一致,提示它们可能具有某些生理功能的相似性.

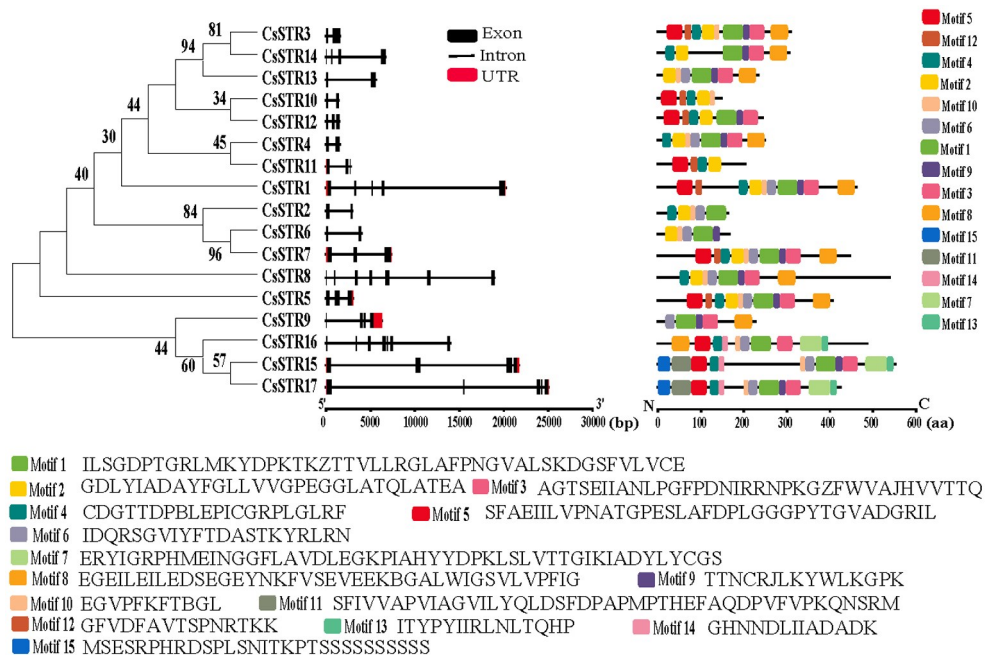


图 2 茶树 STR 蛋白的基因结构与保守基序

Fig. 2 Gene structures and conserved motifs of STR protein in tea plant

2.4 *CsSTR* 基因的表达模式

组织表达模式分析结果表明,进化关系较近的 *CsSTR* 基因常具有相似的组织表达模式(图 3A). *CsSTR1*、*2*、*3*、*4*、*8*、*12* 基因在茶树顶芽中具有相对较高的表达量, *CsSTR10* 和 *14* 在茶树花中的表达量较高, *CsSTR9* 在茶树果中的表达量较高,茶树幼叶组织中 *CsSTR5* 基因的表达量较高,成熟叶中基因 *CsSTR7*、*9* 和 *11* 的表达量较高, *CsSTR13*、*15*、*16*、*17* 则在茶树的根中具有相对较高的表达量.与对照 CK 相比,低温冷驯化处理, *CsSTR17* 与 *CsSTR8*、*11* 分别在低温驯化处理后 6 h(CA1_6h) 和 7 d(CA1_7d) 呈现明显上调表达;再冻驯化处理后 7 d(CA2_7d) 后, *CsSTR4* 基因明显上调表达,而基因 *CsSTR1*、*7*、*17* 则出现下调表达.脱驯化处理后(DA_7d), *CsSTR1*、*9*、*15* 的表达量下调,而 *CsSTR3*、*5*、*8* 的表达量上调(图 3B).盐胁迫或 PEG 模拟干旱处理茶树后,基因 *CsSTR2*、*4*、*6*、*10*、*11*、*13*、*14* 的表达量无明显变化, *CsSTR12* 的表达量上调,其他 *CsSTR* 基因的表达量都呈现下调(图

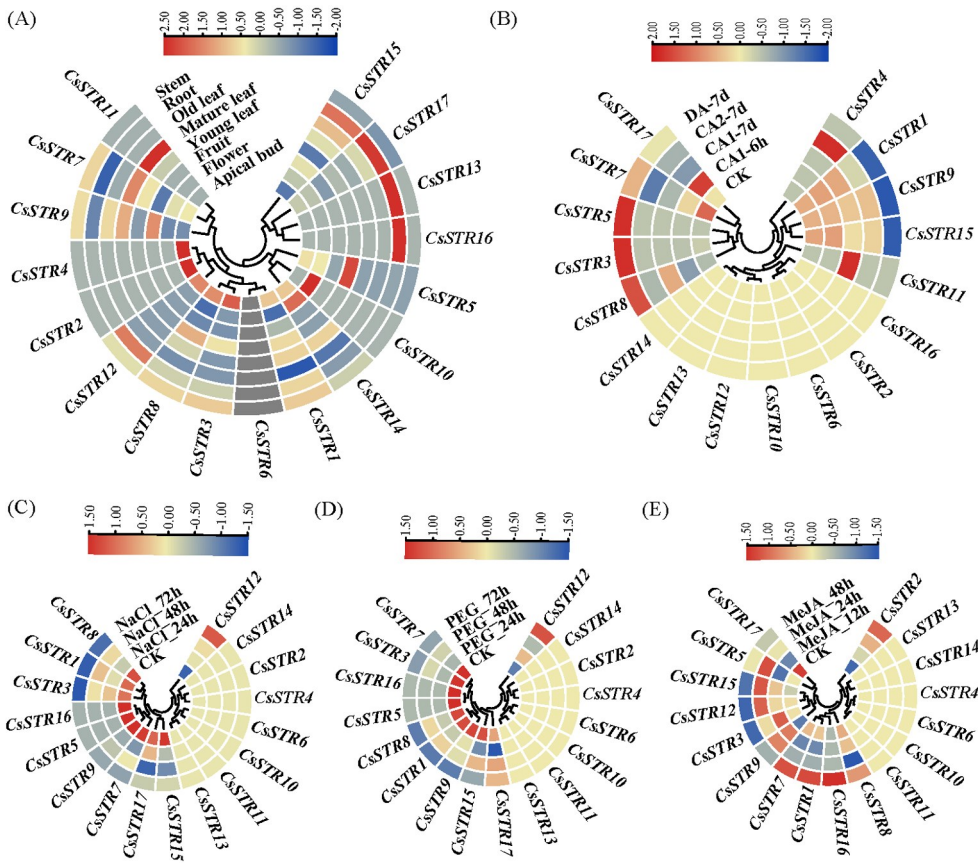
3C、D).MeJA 处理 12 h 后,基因 *CsSTR3*、*9*、*15* 的表达量明显上调,而 *CsSTR1*、*5*、*7*、*17* 的表达量下调(图 3E).MeJA 处理 24 h 后, *CsSTR2*、*5*、*9*、*12* 和 *15* 的表达量明显上调, *CsSTR1*、*7*、*8*、*17* 的表达量下调;MeJA 处理 48 h 后, *CsSTR1*、*2*、*7*、*16* 的表达量明显上调, *CsSTR3*、*12*、*15*、*17* 的表达量明显下调(图 3E).

2.5 *CsSTR* 基因启动子的顺式作用元件

CsSTR 基因启动子区含有许多激素和逆境响应相关的顺式元件(图 4).激素响应相关的顺式元件如 MeJA 响应元件 TGACG-motif 和 CGTCA-motif;赤霉素(Gibberellin, GA)响应元件 P-box、TATC-box 和 GARE-motif;脱落酸(Abscisic acid, ABA)响应元件 ABRE;水杨酸(Salicylic acid, SA)响应元件 TCA-element;生长素(Auxin)响应元件 TGA-element、AuxRR-core 等.逆境反应顺式元件如 TC-rich repeats、ARE、LTR、MBS、GC-motif、WUN-motif 等. *CsSTR* 基因启动子区顺式作用元件的数量在 6~20 个,其中 ARE、ABRE、

TGACG-motif,CGTCA-motif 和 TCA-element 是出现频率较高的顺式作用元件.这些分析结果表明

CsSTR 基因表达受内外因素的调节,在茶树生长发育和逆境反应中发挥作用.



注:(A)不同组织,(B)冷冻驯化,(C)盐胁迫,(D)PEG 模拟干旱胁迫,(E)MeJA 处理.

图 3 CsSTR 基因表达热图

Fig. 3 Heat maps of CsSTR gene expression

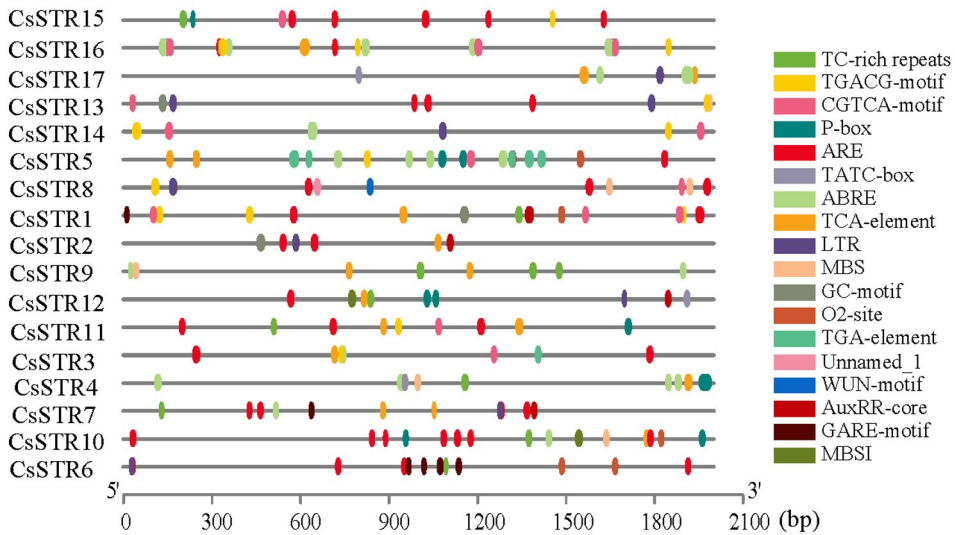
2.6 CsSTR 基因上游结合转录因子的调控网络

利用 17 个 CsSTR 基因起始密码子 ATG 上游 600 bp 的核酸序列,对与 CsSTR 基因上游结合的转录因子进行了分析.结果显示(图 5),共有 158 个转录因子与参与调控 17 个 CsSTR 基因的表达. ERF、Zinc finger、MYB、bZIP、HD-Zip、MADS 家族转录因子以及其他转录因子家族的少量成员在 CsSTR 基因上游呈现富集.其中,ERF 家族转录因子是与 CsSTR 基因上游结合最多的蛋白质,共有 20 个 ERF 转录因子与 17 个 CsSTR 基因形成了 37 种调控关系,其中一些 ERF 转录因子对几个 CsSTR 基因都具有调控作用,如 Int-type ERF、ERF8、AP2 等.16 个 Zinc finger 转录因子、16 个 MYB 转录因子和 12 个 bZIP 转录因子与 CsSTR 基因分别形成了 26 种、17 种和 11 种调控关系.另一方面,基因 CsSTR3 和 CsSTR6 上游只有一个转录因子识别位点,分别为 MYB67 和 MYB23.基

因 CsSTR16 和 CsSTR17 上游调控转录因子数量较多,分别有 21 和 32 个转录因子参与调控 CsSTR16 和 CsSTR17 基因的表达(图 5).

3 讨论

茶是世界公认的三大健康饮料之一,人们已从茶叶中发现包括生物碱、儿茶素、色素等化合物 600 多种.目前,围绕 STR 人们已在多种植物中开展了系列研究,但关于茶树 STR(CsSTR)的研究还未见报道.基于茶树基因组数据库,我们共鉴定出 17 个 CsSTR 基因(表 1),这与模式植物拟南芥(15 个 STR 基因)和水稻(21 个 STR 基因)中鉴定得到的 STR 基因数目相近,表明 STR 基因数目在进化上比较保守.分析结果显示,CsSTR 基因及其蛋白在这些物理性状方面差异较大.茶树中多个 CsSTR 基因的存在及其展现出的不同物理性状,提示它们在茶树生命活动中可能具有多方面的生



顺式元件	生物学过程
TC-rich repeats	cis-acting element involved in defense and stress responsiveness
TGACG-motif	cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
CGTCA-motif	cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
P-box	gibberellin-responsive element
ARE	cis-acting regulatory element essential for the anaerobic induction
TATC-box	cis-acting element involved in gibberellin-responsiveness
ABRE	cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness
TCA-element	cis-acting element involved in salicylic acid responsiveness
LTR	cis-acting element involved in low-temperature responsiveness
MBS	MYB binding site involved in drought-inducibility
GC-motif	enhancer-like element involved in anoxic specific inducibility
O2-site	cis-acting regulatory element involved in zein metabolism regulation
TGA-element	auxin-responsive element
Unnamed_1	cis-acting element involved in phytochrome down-regulation expression
WUN-motif	wound-responsive element
AuxRR-core	cis-acting regulatory element involved in auxin responsiveness
GARE-motif	gibberellin-responsive element
MBSI	MYB binding site involved in flavonoid biosynthetic genes regulation

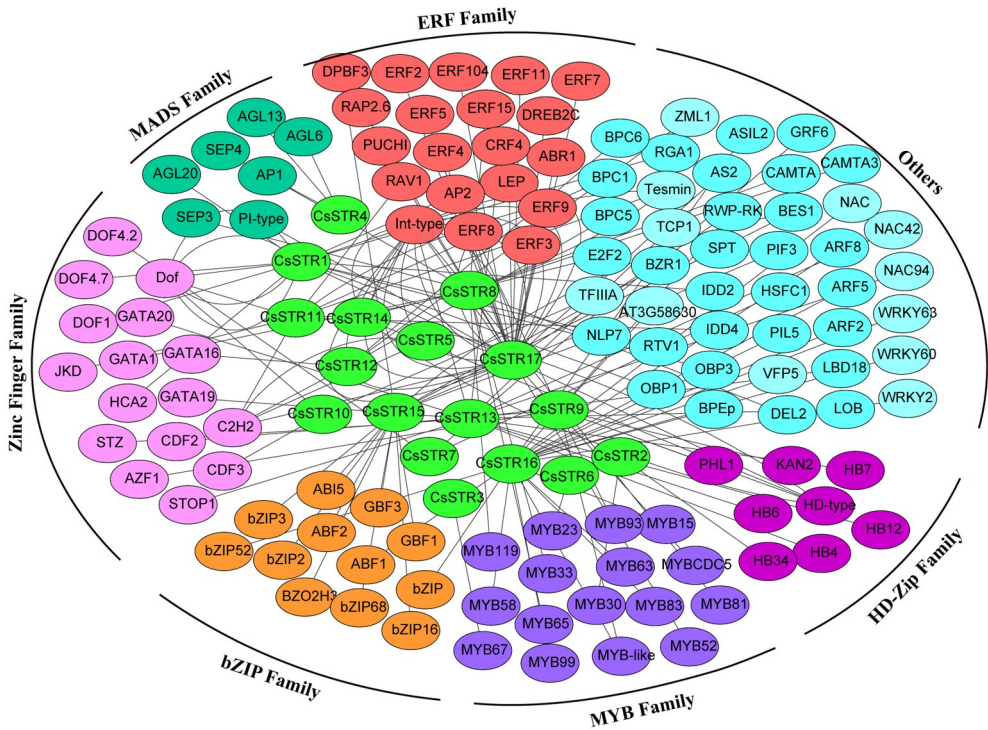
图 4 *CsSTR* 基因启动子区顺式调控元件的分布Fig. 4 Distribution of cis-regulation elements in the promoter regions of *CsSTR* genes

理功能.亚细胞定位预测分析显示,*CsSTR* 蛋白定位在液泡中(表 1),这与报道的 STR 蛋白定位结果相同^[3],但还需要后续进一步实验证实.进化关系较近的 *CsSTR* 基因其基因结构并不相同(图 1,图 2),表明他们在基因的表达调控上可能存在一定的差异性.

进化上同源关系较近的基因往往具有相似的生物学功能.已有研究表明,蛇根木 STR 蛋白、蛇根草 STR 蛋白、长春花 STR 蛋白、以及小蔓长春花 STR 蛋白都具有催化色胺和裂环马钱子苷合成异胡豆苷的功能^[6,8-9].KIBBLE 等^[29]的研究表明,位于类群 I 中的拟南芥 STR 蛋白 AT1G74010.1、AT1G74000.1、AT1G74020.1 不具有催化合成异胡豆苷的生化功能,因此,类群 I 中的 *CsSTR* 蛋白是否具有催化异胡豆苷合成的生化活性尚需进一

步研究.类群 II 中拟南芥 STR 蛋白 AT3G51420.1、AT3G51430.1、AT3G51440.1、AT3G51450.1 在防卫反应中具有重要作用^[18],类群 III 中水稻 STR 蛋白 LOC_Os03g15710.1 参与雄蕊的器官发育过程^[25],提示类群 II 中 *CsSTR*15、16、17 以及类群 III 中 *CsSTR*5 可能分别在防卫反应和花发育中具有作用.

基因表达分析提示 *CsSTR* 基因在组织发育和抗逆反应中有重要作用.*CsSTR*2、3、4、7、8、9、11、12、14 在茶树芽和叶组织中具有较高的表达量(图 3A),而且这些 *CsSTR* 基因启动子区大都含有激素响应元件(图 4),暗示它们通过响应激素信号参与调控茶树芽和叶的发育.对 *CsSTR* 基因上游结合转录因子的分析结果显示,多数在芽和叶中具有较高表达量的 *CsSTR* 基因上游具有 MADS,

图5 *CsSTR* 基因上游结合转录因子的调控网络Fig. 5 Transcription factor regulatory network of *CsSTR* gene

MYB, ERF 和 Zinc Finger 结合位点(图5), 已有研究表明这些转录因子在植物芽和叶发育中有重要作用^[29-30].

茶树是一种以芽和叶利用为主的经济作物, 对上述 *CsSTR* 基因的生化功能进行研究, 鉴定出具有催化异胡豆苷合成活性的 *CsSTR* 基因, 对于提高茶叶附加值有重要意义。

植物的抗寒反应主要分为受 CBF 调节或 ABA 调节的信号途径, 低温下 ABA 调控基因的启动子区一般具有 ABRE 顺式反应元件, CBF 调节基因的启动子区一般还具有 LTR 顺式反应元件^[31-32]. 响应冷驯化处理的 *CsSTR* 基因启动子区都具有 ABRE 或 LTR 顺式反应元件(图3, 图4), 表明 CBF 或 ABA 调节的信号参与了调控这些 *CsSTR* 基因的表达. 激素在调控植物的逆境反应中有重要作用^[33]. 盐胁迫和 PEG 模拟干旱胁迫处理下 *CsSTR* 基因的表达变化趋势基本一致, 分析显示这些 *CsSTR* 基因的启动区大都具有防御和胁迫响应的 TC-rich repeats 元件和激素响应元件(图3, 图4). 响应 MeJA 处理的 *CsSTR* 基因启动子区大都具有 MeJA 反应元件(图3, 图4). 上游转录因子分析显示, ERF、Zinc Finger、MYB、bZIP、MADS、HD-Zip 等转录因子是与 *CsSTR* 基因上游结合最多的蛋白质(图5). 已有研究表明, 这些转录因子在调控植物的低温反应、干旱、盐胁迫以及应

答 MeJA 信号中都具有重要作用^[29, 33-35], 表明在茶树遭受冷、干旱、盐胁迫、MeJA 信号诱导后, *CsSTR* 基因在这些转录因子的调控下参与相应的应答反应. 在应答逆境或 MeJA 信号反应中, *CsSTR* 基因表达变化的时间和表达趋势并不一致(图3), 说明茶树对上述逆境或 MeJA 的应答反应是一个多基因参与的复杂调控过程, 不同 *CsSTR* 基因可能受不同转录因子的调控。

4 结论

从茶树基因组鉴定出 17 个 STR 基因, 对其蛋白理化特征进行了分析. 除了 *CsSTR*1、8、15、16, 大部分 *CsSTR* 基因的内含子数目都在 1 ~ 3 之间; *CsSTR* 蛋白含保守基序的数量在 4 ~ 12 之间. *CsSTR*3、4、10、11、12、13、14 与蛇根木、萝芙木、长春花和喜树中的 STR 位于同一进化分支. *CsSTR* 基因表达受低温、干旱、盐胁迫以及茉莉酸甲酯调控, 大部分 *CsSTR* 基因在顶芽、成熟叶和根中的表达量较高. *CsSTR* 基因启动子区含有许多与生长发育和逆境反应相关的元件. ERF、MYB、Zinc Finger、bZIP 家族转录因子是与 *CsSTR* 基因启动子结合较多的蛋白. STR 是 TIA 合成的关键酶, 而茶叶是一种具有重要健康的饮品, 但其药理作用不清. 哪些 *CsSTR* 基因真正具有催化异胡豆苷合成的生化功能? 哪些 *CsSTR* 基因参与茶树逆境反

应,其应答机制是什么?还需要进一步的研究来对其进行解析.本研究为 CsSTR 的酶活鉴定和功能分析提供了资料,对茶树药理作用的挖掘、利用,以及抗性育种都具有重要意义.

参考文献:

- [1] 向蓓蓓,朱晔荣,王勇.长春花吲哚生物碱合成途径的基因工程研究进展[J].生物学通报,2010,45(10):4-8.
XIANG Beibei, ZHU Yerong, WANG Yong. Research advances on biosynthetic pathway of pharmaceutical indole alkaloids by means of genetic engineering in *Catharanthus roseus*[J]. Bulletin of Biology, 2010, 45(10): 4-8.
- [2] SHARMA A, VERMA P, MATHUR A, et al. Overexpression of tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase enhanced terpenoid indole alkaloid pathway activity and antineoplastic vinblastine biosynthesis in *Catharanthus roseus*[J]. Protoplasma, 2018, 255(5): 1281-1294.
- [3] BROWN S, CLASTRE M, COURDAVAULT V, et al. De novo production of the plant-derived alkaloid strictosidine in yeast[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(11): 3205-3210.
- [4] ALMAGRO L, GUTIERREZ J, PEDREÑO M A, et al. Synergistic and additive influence of cyclodextrins and methyl jasmonate on the expression of the terpenoid indole alkaloid pathway genes and metabolites in *Catharanthus roseus* cell cultures[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2014, 119(3): 543-551.
- [5] MCKNIGHT T D, BERGEY D R, BURNETT R J, et al. Expression of enzymatically active and correctly targeted strictosidine synthase in transgenic tobacco plants[J]. Planta, 1991, 185(2): 148-152.
- [6] YAMAZAKI Y, SUDO H, YAMAZAKI M, et al. Camptothecin biosynthetic genes in hairy roots of *Ophiorrhiza pumila*: Cloning, characterization and differential expression in tissues and by stress compounds[J]. Plant & Cell Physiology, 2003, 44(4): 395-403.
- [7] TREIMER J F, ZENK M H. Purification and properties of strictosidine synthase, the key enzyme in indole alkaloid formation[J]. European Journal of Biochemistry, 1979, 101(1): 225-233.
- [8] LU Y, WANG H S, WANG W, et al. Molecular characterization and expression analysis of a new cDNA encoding strictosidine synthase from *Ophiorrhiza japonica*[J]. Molecular Biology Reports, 2009, 36(7): 1845-1852.
- [9] 王泓, 谌容, 陈敏, 等. 萝芙木异胡豆苷合成酶基因的克隆与分析[J]. 西北植物学报, 2006(5): 900-905.
WANG Hong, SHEN Rong, CHEN Min, et al. Cloning and analysis of strictosidine synthase in *Rauwolfia verticillata*[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2006, 26(5): 900-905.
- [10] STÖCKIGT J, BARLEBEN L, PANJIKAR S, et al. 3D-Structure and function of strictosidine synthase: The key enzyme of monoterpenoid indole alkaloid biosynthesis[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2008, 46(3): 340-355.
- [11] FACCHINI P J. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 2001, 52: 29-66.
- [12] GAUTAM S, MISHRA A, TIWARI A. *Catharanthus alkaloids* and their enhanced production using elicitors: A review[J]. International Journal of Pharmacy and Technology, 2011, 3(1): 713-724.
- [13] DE BERNONVILLE T D, CARQUEIJEIRO I, LANOUE A, et al. Folivory elicits a strong defense reaction in *Catharanthus roseus*: metabolomic and transcriptomic analyses reveal distinct local and systemic responses[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 40453.
- [14] 刘英. 环境胁迫对长春花 TIAs 生物合成的调控及相关基因表达分析[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2010.
LIU Ying. Environmental regulation and gene expression analysis for biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus*[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2010.
- [15] DUTTA A, SEN J, DESWAL R. New evidences about strictosidine synthase (Str) regulation by salinity, cold stress and nitric oxide in *Catharanthus roseus*[J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2013, 22(1): 124-131.
- [16] MORENO P R H, POULSEN C, VAN DER HEIJDEN R, et al. Effects of elicitation on different metabolic pathways in *Catharanthus roseus* (L)G. Don cell suspension cultures[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1996, 18(2): 99-107.
- [17] LIANG C X, CHEN C, ZHOU P F, et al. Effect of *Aspergillus flavus* fungal elicitor on the production of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* cambial meristematic cells[J]. Molecules, 2018, 23(12): 3276.
- [18] SOHANI M M, SCHENK P M, SCHULTZ C J, et al. Phylogenetic and transcriptional analysis of a strictosidine

- synthase-like gene family in *Arabidopsis thaliana* reveals involvement in plant defence responses[J]. *Plant Biology*, 2009, 11(1): 105-117.
- [19] WAHEED A, HAMID F S, SHAH A H, et al. Response of different tea (*Camellia sinensis* L.) clones against drought stress[J]. *Journal of Materials and Environmental Science*, 2012, 3(2): 395-410.
- [20] SU S W. Tea or coffee: a study of the beverage choice pattern and its affecting factors at teatime in Kaohsiung, Taiwan[J]. *Asia Pacific Management Review*, 2007, 12(4): 245-257.
- [21] WEI C L, YANG H, WANG S B, et al. Draft genome sequence of *Camellia sinensis* var. *sinensis* provides insights into the evolution of the tea genome and tea quality[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(18): 4151-4158.
- [22] 周棋赢, 韩月华, 梁萍, 等. 茶树 NAC 基因的鉴定及其在逆境反应中的表达调控分析[J]. *信阳师范学院学报(自然科学版)*, 2020, 33(4): 567-578.
- ZHOU Qiying, HAN Yuehua, LIANG Ping, et al. Genome-wide identification of NAC genes in tea plant and its expression regulation in stress response[J]. *Journal of Xinyang Normal University(Natural Science Edition)*, 2020, 33(4): 567-578.
- [23] BRACHER D, KUTCHAN T M. Strictosidine synthase from *Rauwolfia serpentina*: analysis of a gene involved in indole alkaloid biosynthesis[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1992, 294(2): 717-723.
- [24] SUN Y Z, LUO H M, LI Y, et al. Pyrosequencing of the *Camptotheca acuminata* transcriptome reveals putative genes involved in camptothecin biosynthesis and transport[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 533.
- [25] KIBBLE N, SOHANI M M, SHIRLEY N, et al. Phylogenetic analysis and functional characterisation of strictosidine synthase-like genes in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Functional Plant Biology: FPB*, 2009, 36(12): 1098-1109.
- [26] ZOU T, LI S C, LIU M X, et al. An atypical strictosidine synthase, OsSTRL2, plays key roles in anther development and pollen wall formation in rice[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 6863.
- [27] LI Y Y, WANG X W, BAN Q Y, et al. Comparative transcriptomic analysis reveals gene expression associated with cold adaptation in the tea plant *Camellia sinensis* [J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 624.
- [28] ZHANG Q, CAI M C, YU X M, et al. Transcriptome dynamics of *Camellia sinensis* in response to continuous salinity and drought stress[J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2017, 13(4): 78.
- [29] LIU J Y, SHERIF M. Hormonal orchestration of bud dormancy cycle in deciduous woody perennials[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 1136.
- [30] 张军霞, 郭巧生, 朱再标, 等. 老鸦瓣芽茎发育相关 MYB 转录因子家族鉴定与分析[J]. *中草药*, 2021, 52(6): 1735-1743.
- ZHANG Junxia, GUO Qiaosheng, ZHU Zaibiao, et al. Identification and analysis of MYB transcription factor family related to stolon development of *Amana edulis* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2021, 52(6): 1735-1743.
- [31] 周棋赢, 韩月华, 潘娟娟, 等. 植物抗寒机理研究进展[J]. *信阳师范学院学报(自然科学版)*, 2019, 32(3): 511-516.
- ZHOU Qiying, HAN Yuehua, PAN Juanjuan, et al. Research progress in plant cold resistance mechanism [J]. *Journal of Xinyang Normal University(Natural Science Edition)*, 2019, 32(3): 511-516.
- [32] SAZEGARI S, NIAZI A. Isolation and molecular characterization of wheat (*Triticum aestivum*) dehydration responsive element binding factor (DREB) isoforms[J]. *Australian Journal of Crop Science*, 2012, 6(6): 1037-1044.
- [33] GUPTA P, SHARMA R, SHARMA M K, et al. Signaling cross talk between biotic and abiotic stress responses in soybean[C]//MIRANSARI M. Abiotic and biotic stresses in soybean production. Oxford: Academic press, 2016: 27-52.
- [34] QI X W, FANG H L, YU X, et al. Transcriptome analysis of JA signal transduction, transcription factors, and monoterpene biosynthesis pathway in response to methyl jasmonate elicitation in *Mentha canadensis* L [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(8): 2364.
- [35] WANG K, DING Y F, CAI C, et al. The role of C₂H₂ Zinc finger proteins in plant responses to abiotic stresses[J]. *Physiologia Plantarum*, 2019, 165(4): 690-700.