

茶树 OSCA 基因家族的鉴定及表达分析

刘丹丹, 吴 琼, 焦小雨, 孙明慧, 王文杰*

安徽省农业科学院茶叶研究所, 安徽合肥 230001

摘 要: 钙通透性阳离子通道蛋白 (OSCA) 在植物调节高渗胁迫中发挥着重要作用。为了解 OSCA 基因家族在茶树响应干旱胁迫中的作用, 本研究基于茶树全基因组数据对 OSCA 基因家族进行鉴定, 分析 *CsOSCA*s 基因和蛋白结构以及启动子顺式作用元件, 并对 *CsOSCA*s 在茶树不同组织、不同抗旱性品种间和干旱胁迫下的表达模式进行分析。结果表明: 茶树基因组包含 12 个 OSCA 基因家族成员, 分别命名为 *CsOSCA1*~*CsOSCA12*; *CsOSCA*s 基因编码的氨基酸序列长度为 667~831 bp, 蛋白分子量在 76 630.55~93 563.99 kDa 之间, 等电点在 6.15~9.33 之间, 含有 9~12 个跨膜结构域, 均含有特征保守结构域 DUF221, 根据系统进化关系可以分为 4 个亚族; 10 个 *CsOSCA*s 基因定位于茶树 7 条染色体上, 2 个 *CsOSCA*s 基因定位于未锚定染色体的 contig 上; *CsOSCA*s 基因编码的蛋白二级结构含有 32%~38% 的跨膜结构和 60%~68% 的 α -螺旋; *CsOSCA*s 基因具有组织表达特异性, *CsOSCA2*、*CsOSCA3*、*CsOSCA11*、*CsOSCA12* 基因在干旱敏感的品种 CN98 中的表达量显著高于其他 2 个耐旱品种, 9 个基因响应 PEG 胁迫, 其中 *CsOSCA2*、*CsOSCA3*、*CSOSCA5*、*CsOSCA8*、*CsOSCA10* 和 *CsOSCA12* 受干旱胁迫强烈诱导; 进一步分析启动子顺式作用元件显示, 6 个基因含有干旱诱导响应元件, 11 个基因含有脱落酸响应元件。由此推测茶树 OSCA 基因家族在茶树响应干旱胁迫中发挥着重要的作用, 此研究为茶树 OSCA 基因功能分析与茶树抗逆性研究提供了参考。

关键词: 茶树; OSCA 基因家族; Ca^{2+} 通道; 全基因组表达分析

中图分类号: S31

文献标识码: A

Identification and Expression Analysis of OSCA Gene Family in Tea Plant

LIU Dandan, WU Qiong, JIAO Xiaoyu, SUN Minghui, WANG Wenjie*

Tea Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei, Anhui 230001, China

Abstract: The hyperosmotic Ca^{2+} channel protein OSCA is crucial for controlling hyperosmotic stressors in plants. To understand the role of the OSCA gene family in tea plant response to drought stress, this study was conducted to identify the OSCA gene family based on the whole genome data of tea plant and analyze the gene and protein structures and promoter cis-acting element, and analyze the expression patterns of *CsOSCA*s in different tissues of tea plant, among different drought-resistant varieties and under drought stress. The results showed that the tea plants genome contained 12 members of the OSCA gene family, named *CsOSCA1*-*CsOSCA12*. The amino acid sequences encoded by the *CsOSCA*s were 667–831 bp in length, with protein molecular weight ranging from 76 630.55 kDa to 93 563.99 kDa and isoelectric points ranging from 6.15 to 9.33, containing 9–12 transmembrane structural domains, all containing the characteristic conserved structural domain DUF221, which could be divided into four subfamilies based on phylogenetic relationships. Ten *CsOSCA*s were localized to seven chromosomes of *Camellia sinensis* and two *CsOSCA*s were localized to the contig of unanchored chromosomes. The secondary structure of the *CsOSCA*s contained 32%–38% transmembrane structure and 60%–68% α -helix. The *CsOSCA*s were tissue expression specific, and *CsOSCA2*, *CsOSCA3*, *CsOSCA11*, and *CsOSCA12* were significantly higher in the drought-sensitive variety CN98 than those in the other two drought-tolerant varieties. Nine genes were responded to PEG stress, among which *CsOSCA2*, *CsOSCA3*, *CSOSCA5*,

收稿日期 2022-10-12; 修回日期 2022-12-20

基金项目 安徽省重大专项 (No. 202003a06020021); 安徽省茶叶产业技术体系项目 (No. AHCYJSTX—11)。

作者简介 刘丹丹 (1989—), 女, 助理研究员, 研究方向: 茶树种质资源与品种选育。*通信作者 (Corresponding author): 王文杰 (WANG Wenjie) E-mail: wwj00@126.com。

CsOSCA8, *CsOSCA10*, and *CsOSCA12* were strongly induced by drought stress. Six genes included drought-inducible response elements, and 11 genes contained abscisic acid response elements, according to further examination of the promoter cis-acting elements. It is hypothesized that the *OSCA* gene family of tea plants play an important role in the response to drought stress, and this study would provide a reference for the functional analysis and stress resistance of *OSCA* gene in tea plant.

Keywords: *Camellia sinensis*; *OSCA* gene family; Ca^{2+} channel; genome-wide expression analysis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.01.002

茶树[*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]是一种多年生常绿木本植物^[1],喜漫射光、温暖潮湿的气候以及弱酸性土壤^[2]。低温、干旱、长期辐射、病虫害等非生物胁迫和生物胁迫都会对茶树生长产生不利影响^[3-4]。其中干旱胁迫通过影响茶树生长的土壤和水分条件,严重降低茶叶的产量和品质^[5]。研究人员对 9 个不同品种 13 a 树龄的茶树进行 40 d 干旱处理,茶叶产量下降 27.27%~68.53%^[6]。同时,咖啡因、儿茶素、茶氨酸和游离氨基酸等代谢物也显著较少^[1],从而降低茶叶品质。因而研究茶树是如何特异感受干旱胁迫产生信号的分子机理,挖掘相关的抗旱基因,进而通过分子育种技术获得抗性优良品种,具有重要的研究意义和实用价值。

钙通透性阳离子通道蛋白(hyperosmolarity-gate calcium-permeable channels, *OSCA*)是一种 Ca^{2+} 机械敏感通道^[7],是目前发现的第一个植物高渗胁迫感受蛋白^[8]。*OSCA* 基因于 2014 年在拟南芥中首次报道。研究人员用山梨糖醇模拟干旱条件处理表达了水母发光蛋白的拟南芥植株后,利用 Ca^{2+} 成像技术发现 *oscal1* 突变体胞内钙离子相比于野生型释放量显著减少,然而用不具有渗透胁迫的 Ca^{2+} 诱导剂 H_2O_2 处理时,突变体与野生型之间并无明显差异,表明 *OSCA1* 是特异性渗透胁迫感受器^[8]。*OSCA1* 会在拟南芥的叶、花、根以及保卫细胞等处表达,当进行高渗处理时,突变体的气孔开度不会减小,根系生长受到抑制,也说明了 *OSCA1* 对于渗透感受的重要性^[8]。拟南芥 *oscal1* 突变体中 *OsOSCA1.4* 的过表达补充了 Ca^{2+} 信号传导、根生长和气孔运动的缺陷,以响应高渗和盐胁迫^[9]。在高渗环境下, *AtOSCA1.2* 通过增加细胞内的 Ca^{2+} 浓度,增强对 Na^+ 和 K^+ 的通透性^[10]。植物感知生物和非生物胁迫后往往会引起气孔的关闭^[11],钙通过质膜的快速流入在这种反应中起着重要作用^[12]。THOR 等^[13]报道了拟南芥 Ca^{2+} 渗透通道 *AtOSCA1.3* 在免疫信号转导过程

中控制气孔关闭,然而 *AtOSCA1.3* 并不调节脱落酸诱导的气孔关闭。此外, *OSCA* 作为一种 Ca^{2+} 非选择性阳离子通道蛋白,在植物生长发育过程中发挥着重要作用。有研究指出, *OSCA* 基因家族在植物花中特异表达^[14],参与渗透胁迫下的植物花粉的萌发和花粉管的发育^[3, 15-16]。总之, *OSCA* 家族成员在感受高渗胁迫上是保守的,但在诱导植物产生的抗逆途径上又有区别。

OSCA 基因家族对植物生长发育和响应逆境胁迫都至关重要,并已经在拟南芥^[8]、烟草^[16]、水稻^[14]、小麦^[17]等物种中做了系统的鉴定与功能分析。然而,目前茶树 *OSCA* 基因家族相关研究暂未见报道。因此,我们对茶树 *OSCA* 家族成员进行了全基因组鉴定与系统发育关系分析,并分析了不同组织和干旱胁迫下的表达情况。本课题的开展为后续深入解析茶树 *OSCA* 基因在干旱环境应答中生物学功能和分子机制提供重要参考,有助于进一步研究植物渗透胁迫钙信号通路,为茶树抗性育种提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

干旱胁迫材料:选取安徽省农科院茶叶研究所苗圃中生长良好、长势一致的 1 年生茶树品种舒茶早茶苗,于人工气候室(24 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 的环境温度下稳定生长,转移至 PEG-6000 溶液(浓度为 20%)中进行干旱处理,收集 0、15、30 min 和 1、2、4、8、12、24、48 h 后的第二叶。

组织样本:7 月份安徽省农科院茶叶研究所全国第五轮区试园所在的屯溪区降水量少,茶园土壤干燥,茶农 98 (CN98) 品种已出现明显的干旱胁迫症状,崂山 3 号 (LS3) 和中黄 1 号 (ZH1) 没有出现明显的干旱胁迫症状,此外结合区试园中多年抗旱性观测数据,将此次实验样品 LS3 和 ZH1 定义为耐旱型品种, CN98 定义为干旱敏感型品种。选取上述 3 个茶树品种 (LS3、ZH1 和

CN98) 的成熟叶第二叶, 取样时间为 2022 年 8 月 3 日上午 9 点。以上每种处理均设置 3 次重复, 样本采集后, 置于液氮速冻, 转移至 -80 °C 冰箱备用。

1.2 方法

1.2.1 茶树 OSCA 基因家族成员鉴定与染色体定位分析 从拟南芥基因组数据库 (<https://www.arabidopsis.org/tools/bulk/sequences/index.jsp>) 下载拟南芥 OSCA 基因家族蛋白序列及其功能分类信息。根据拟南芥 OSCA 基因家族的蛋白序列在茶树基因组数据库 (<http://tpia.teaplant.org>) 在线 Blast 比对茶树原变种 (*C. sinensis* var. *sinensis*) 舒茶早品种的最新版基因组蛋白序列, 根据比对结果下载候选序列蛋白并去冗余。为了进一步验证所鉴定的茶树 OSCA 基因家族, 使用 NCBI 保守结构域数据库 (www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi) 对所有检索到的序列进行筛选, 以确定蛋白质是否含有 DUF221 结构域, 最终得到茶树 OSCA 基因家族成员 12 个。为了研究 CsOSCA 蛋白质的性质, 使用在线的 ExPASy-ProtParam 工具 (web.expasy.org/protparam/) 预测分子量 (MW) 和等电点 (pI), 利用 Softberry (<http://linux1.softberry.com/all.htm>) 中的 ProtComp 程序预测上述候选 OSCA 蛋白的亚细胞定位。从茶树的基因注释文件 (GFF3) 中检索 CsOSCA 基因的信息, 利用 Tbttools (v1.09867) 软件中的 Gene Location Visualize from GTF/GFF 进行染色体定位可视化绘图。

1.2.2 茶树 OSCA 基因家族蛋白二级结构、保守基序、基因结构分析 使用 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) 在线工具分析 CsOSCA 蛋白二级结构和跨膜结构域。另外, 使用 MEME (<http://memesuite.org/tools/meme>) 在线分析 CsOSCA 蛋白的保守基序, 基序数目设置为 20, 其他参数设置为默认值。利用 Pfam 数据库 (<http://pfam.xfam.org/search#tabview=tab1>) 搜索 CsOSCA 基因家族保守 Pfam 得到的结果文件用 TBTools 软件进行可视化绘图。在茶树基因注释 (GFF3) 文件中检索 CsOSCA 基因的外显子-内含子结构信息, 导入在线程序 GSDS2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 比较各自的全长序列结构并生成图表。

1.2.3 茶树 OSCA 基因家族系统进化树分析 根据文献信息下载拟南芥^[8]和水稻^[14] OSCA 基因家族蛋白序列, 使用 MEGA7 (<https://itol.embl.de/>)

在线软件中的 Clustal W 方法对茶树、拟南芥和水稻 OSCA 蛋白序列进行比对, 使用邻接法 (neighbor-joining method) 构建系统进化树。

1.2.4 茶树 OSCA 基因家族启动子顺式作用元件与反式作用因子预测分析 为了分析 OSCA 基因家族启动子序列中可能存在的顺式元件, 使用 TBTools 软件批量提取 OSCA 基因家族成员 ATG 上游的 1500 bp 的启动子序列区域, 将上一步获得的启动子序列放进 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线网站分析启动子的顺式作用元件, 根据返回结果 tab 文件筛选统计与逆境胁迫相关的顺式元件, 使用 Tbttools 软件的 imple BioSequence Viewer 功能绘图。

CsOSCA 基因启动子可能结合的反式作用因子预测以拟南芥为参考, 在 JASPAR (<https://jaspar.genereg.net/>) 数据库的 Plantae 模块中选择与干旱胁迫相关的转录因子家族 AP2/EREDP、bZIP、DOF、MYB 和 WRKY 成员共计 181 个转录因子, 添加到购物车, 输入 ATG 上游的 1500 bp 的启动子序列区域, Relative profile score threshold 选择 95%, 根据预测结果统计出相对分数大的转录因子。

1.2.5 茶树 OSCA 基因家族组织特异性分析 在 NCBI 中下载茶树在不同组织的 RNA-seq 数据 (登录号: PRJNA79643)。使用 TBtools (v1.082) 软件中 HeatMap 对各转录组基因的 FPKM 值进行归一化处理并进行表达模式可视化分析。

1.2.6 茶树 RNA 的提取和实时荧光定量 PCR 用 TBtools (v1.082) 软件提取已下载的茶树基因组数据库中茶树 OSCA 基因家族的 CDS 序列, 并通过 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) 在线网站进行引物设计 (表 1)。选用茶树 β -actin (登录号 KJ946252) 作为内参基因。采用多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司] 提取上述处理的总 RNA, 电泳检测完整性。使用 PrimeScriptTM RT Master Mix (perfect real time) 试剂盒合成 cDNA 用于实时荧光定量 PCR。利用 LightCycle[®] 96 荧光定量 PCR 仪 [罗氏诊断产品 (上海) 有限公司] 进行 qRT-PCR, 反应程序为: 94 °C 30 s; 94 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环; 反应体系参照 SYBR Green Pro Taq HS qPCR Kit 试剂盒 (湖南艾科瑞生物工程有限公司), 反应结束后分析荧光值变化曲线及熔解曲线, 每个样品均设置 3 次技

表 1 本研究引物序列
Tab. 1 Primer sequences of this study

引物名称 Primer name	正向引物序列 (5'-3') Forward primer sequence (5'-3')	反向引物序列 (5'-3') Reverse primer sequence (5'-3')
β-actin	GCCATCTTTGATTGGAATGG	GGTGCCACAACCTTGATCTT
CsOSCA1	TTGCCGCGTCACATTCTTACA	TGGCACTTGGAAGATAACCCG
CsOSCA2	TCTGGAACGTGCCACAGAAC	TTTGCTAGGCTGTGGTGTGT
CsOSCA3	TTGGTGAAAAGTGCAGAGGGA	AACAAGGTATGCAAGGGCGA
CsOSCA4	CCATCGATTTTGCAAGGGGC	TCCTCATCCATCGCTTGTGG
CsOSCA5	ACGGGGTGCCGAAAACCTTTA	CCCGCGACTCAATCTTCACT
CsOSCA6	GCTGTGGACTGTTCAAGCAC	GCAGACCATAACCGAGACTT
CsOSCA7	AATGGTGGATGGATGGGCTG	TCCATTGCCTCTTCACGGTC
CsOSCA8	AAGTGCAGTCCATCTGAGCC	ACCAAAGCTGCATAGCGAGT
CsOSCA9	TTCTGTCTGAAGGTTGAGGGC	AGGCTTTCCGCAAGTAACGA
CsOSCA10	CTCGAGAAAGGTTGAGGCGT	AGCACCATAACGCGACTTGA
CsOSCA11	CACAGGAACTGCGTTTGAGC	CCAGCCCATCCATCAACCAT
CsOSCA12	ACTCTCCCTGATCTTCGCCT	GCTCAAGCTCGGTGGAATGA

术重复。

1.3 数据处理

用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 算法计算基因相对表达水平，使用 SPSS 17.0 软件对数据显著性进行分析，使用 GraphPad prism 5 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 茶树 *OSCA* 基因家族成员的鉴定与染色体定位

经过与拟南芥 *OSCA* 基因家族蛋白序列比对该去冗余，蛋白结构域分析验证，最终获得 12 个 *OSCA* 基因家族成员（表 2）。*CsOSCA*s 基因编码的氨基酸序列长度为 667~831 bp。蛋白分子量在 76 630.55~93 563.99 kDa 之间，等电点在 6.15~

9.33 之间，含有 9~12 个跨膜结构域。通过与拟南芥基因家族成员进行比对，按照茶树基因组编号顺序将它们分别命名为 *CsOSCA1*~*CsOSCA12*。

根据茶树基因组信息，茶树 *OSCA* 基因家族在染色体上的分布均匀（图 1），10 个 *CsOSCA*s 基因定位于茶树 7 条染色体上，2 个 *OSCA* 基因定位于未锚定染色体的 contig 上，其中 8 号染色体上有 3 个 *OSCA* 基因，数量最多。

2.2 茶树 *OSCA* 基因家族蛋白的二级结构、保守基序、基因结构分析

蛋白质的二级结构的预测结果显示，茶树 *OSCA* 基因编码的蛋白二级结构含有大量的跨膜结构和 α -螺旋（表 3）， α -螺旋的比例在 60%~68% 之间，跨膜螺旋在 32%~38% 之间，另外还含有

表 2 *CsOSCA*s 基因特征统计
Tab. 2 Characteristics of *CsOSCA* genes

基因名称 Gene name	基因位置 Gene locus	氨基酸长度 Amino acid length (aa)	等电点 pI	分子量 MW/kDa	分组 Group	跨膜结构域 TM
CsOSCA1	CSS0001540.1	667	8.42	76 630.55	II	9
CsOSCA2	CSS0005377.1	747	8.59	85 811.48	I	11
CsOSCA3	CSS0006392.1	816	9.33	93 563.99	I	11
CsOSCA4	CSS0011828.1	766	9.03	86 909.33	I	11
CsOSCA5	CSS0014208.1	831	6.15	93 489.8	IV	12
CsOSCA6	CSS0022208.1	741	6.74	84 397.28	II	11
CsOSCA7	CSS0023162.1	770	8.69	88 237.56	I	11
CsOSCA8	CSS0024791.1	739	8.85	83 749.22	II	11
CsOSCA9	CSS0025177.1	720	9.22	82 211.47	III	11
CsOSCA10	CSS0026837.1	708	8.36	80 462.92	II	11
CsOSCA11	CSS0032724.1	772	8.06	88 692.6	I	11
CsOSCA12	CSS0035586.1	726	9.15	81 611.54	III	11

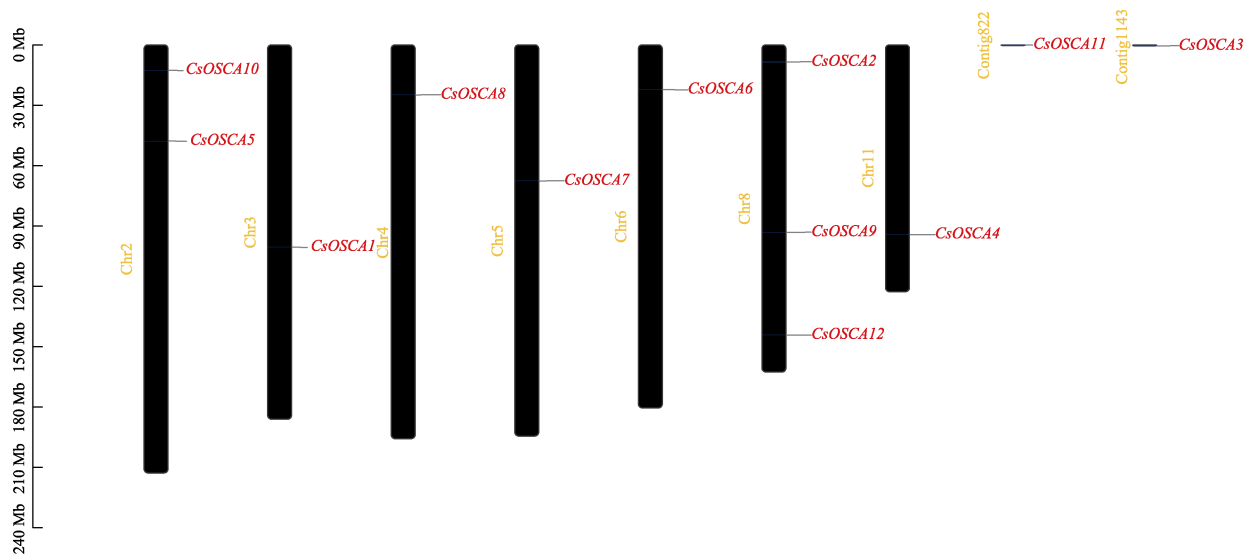


图 1 *CsOSCA*s 基因的染色体定位
Fig. 1 Chromosomal location of *CsOSCA* genes

12%~23%的不规则卷曲以及少量的 β -转角。

为了进一步分析茶树 *OSCA* 家族基因的保守性，分析其保守序列和保守基序。如图 2A 所示，茶树 *OSCA* 基因家族蛋白均含有 3 个保守结构域，分别是 late exocytosis (RSN1_TM, Pfam: PF13967)、cytosolic domain of 10 TM putative phosphate transporter(DUF4463, PHM7_cyt, Pfam: PF14073)和 Calcium dependent channel(DUF221, RSN1_7TM, Pfam: PF02714)。保守基序结果显示，除了 *CsOSCA5* 以外，其他 *CsOSCA* 序列都高度保守，motif1、motif4、motif9 属于 PHM7_cyt 结构域，motif2、motif3、motif5、motif12 构成 RSN1_7TM 结构域，motif6、motif8、motif11、motif15、motif17 构成 RSN1_TM。*CsOSCA2*、*CsOSCA3*、*CsOSCA4*、*CsOSCA7* 和 *CsOSCA11* 蛋白基序组成模式相似，*CsOSCA9* 和 *CsOSCA12* 保守基序组成相似，*CsOSCA1*、*CsOSCA8* 和 *CsOSCA10* 保守基序组成相似（图 2B）。

表 3 *CsOSCA*s 蛋白二级结构分析
Tab. 3 Secondary structure of *CsOSCA* proteins

蛋白 Protein	不规则卷曲 Randomcoil/%	α -螺旋 Alpha helix/%	β -转角 Beta strand/%	跨膜结构域 TM	跨膜螺旋 TM helix/%
<i>CsOSCA1</i>	16	68	4	9	35
<i>CsOSCA2</i>	19	65	2	11	35
<i>CsOSCA3</i>	23	60	2	11	32
<i>CsOSCA4</i>	18	65	3	11	34
<i>CsOSCA5</i>	22	66	4	12	37
<i>CsOSCA6</i>	18	63	3	11	36
<i>CsOSCA7</i>	18	65	3	11	35
<i>CsOSCA8</i>	20	66	3	11	36
<i>CsOSCA9</i>	13	68	3	11	38
<i>CsOSCA10</i>	12	67	3	11	38
<i>CsOSCA11</i>	18	63	3	11	34
<i>CsOSCA12</i>	13	68	3	11	37

根据茶树 *OSCA* 基因家族结构绘制的图谱（图 3）可以看出，*CsOSCA11* 的序列最长，12 个 *CsOSCA*s 基因外显子数范围在 1~11 个之间，其中 *CsOSCA2*、*CsOSCA3*、*CsOSCA4*、*CsOSCA7*、*CsOSCA8* 和 *CsOSCA11* 的外显子数为 11 个，*CsOSCA6*、*CsOSCA10* 的外显子数为 10 个，

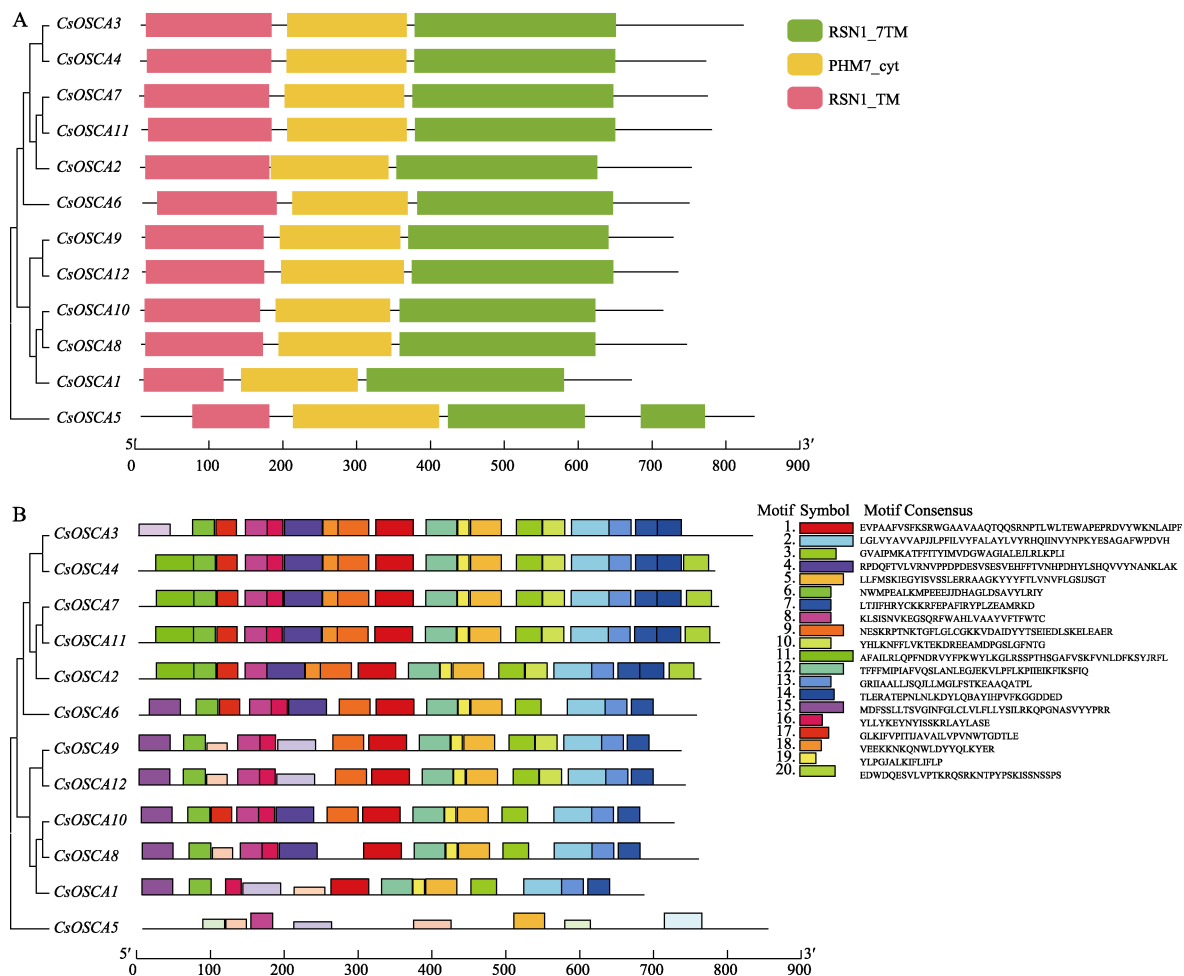


图 2 *CsOSCA*s 蛋白保守结构域 (A) 和保守基序 (B) 分析
Fig. 2 Analysis of conserved domain (A) and motif (B) of *CsOSCA*s in tea plants

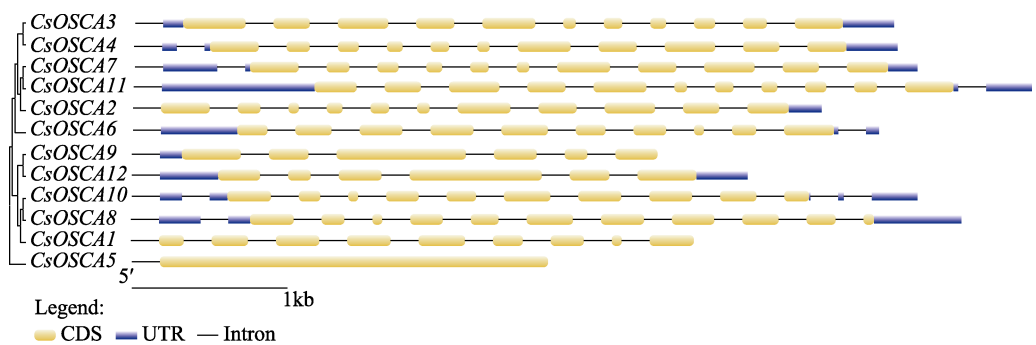


图 3 茶树 *OSCA* 基因家族成员结构
Fig. 3 Gene structure of *CsOSCA* gene family members

CsOSCA1 的外显子数量为 9 个, *CsOSCA9* 和 *CsOSCA12* 外显子数量均为 6 个, *CsOSCA5* 的外显子数量为 1 个。

2.3 茶树 *OSCA* 基因家族蛋白系统进化树分析

利用拟南芥 (15 个)、水稻 (11 个) 与茶树 (12 个) *OSCA* 家族蛋白全长序列构建系统发育

树 (图 4)。根据系统进化关系, 这 38 个 *OSCA* 蛋白可分为 4 个亚族, 分别命名为 I~IV。茶树、拟南芥和水稻在 4 个亚族中均有分布。茶树 *OSCA* 基因家族中有 5 个明显的垂直同源基因对, 分别是: I 亚族的 *CsOSCA4* 和拟南芥 *OSCA1.7*, II 亚族的 *CsOSCA8* 和拟南芥 *OSCA2.2*、*CsOSCA1* 和水稻 *OsOSCA2.5*, IV 亚族的 *CsOSCA6* 和水稻

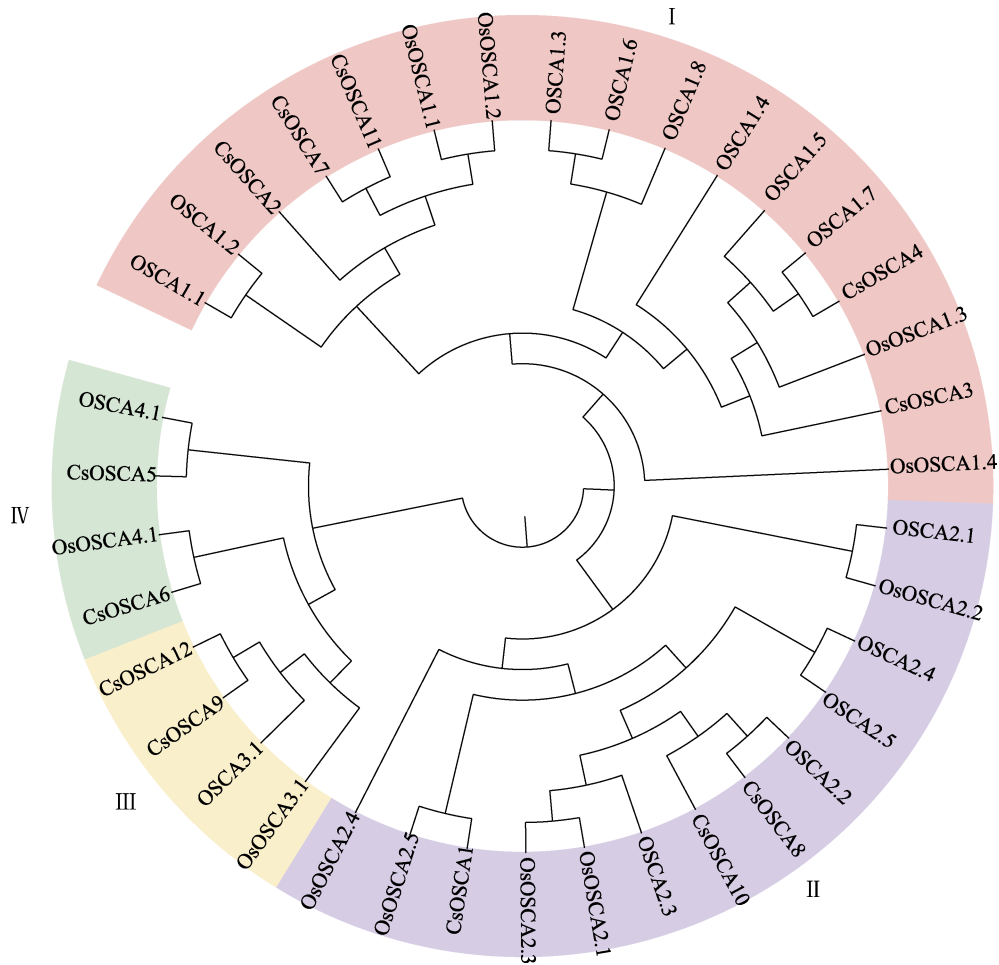


图 4 茶树 (Cs)、拟南芥 (At) 和水稻 (Os) OSCA 蛋白系统发育分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of OSCA proteins from *C. sinensis* (Cs), *Arabidopsis thaliana* (At) and *Oryza sativa* (Os)

OsOSCA4.1, CsOSCA5 和拟南芥 OSCA4.1。

2.4 茶树 OSCA 基因家族组织特异性表达

通过分析芽 (bud)、花 (flower)、果实 (fruit)、嫩叶 (young leaf)、成熟叶 (mature leaf)、老叶 (old leaf)、根 (root) 和茎 (stem) 8 个茶树组织转录组数据^[18], 绘制茶树 OSCA 家族在茶树不同组织中的表达模式热图 (图 5)。CsOSCA3、CsOSCA6 和 CsOSCA7 在芽中表达量较高; CsOSCA1、CsOSCA4、CsOSCA9 在花中表达量较高, 在其他组织中含量很低或不表达; CsOSCA2、CsOSCA6、CsOSCA7 在根中的表达量较高; CsOSCA8 在老叶中表达量较高; CsOSCA10 在成熟叶、老叶和茎中表达量较高; CsOSCA11 在茎中表达量较高, 在其他组织中表达量较低; CsOSCA12 在嫩叶中表达量最高。

2.5 CsOSCA 基因在不同抗旱品种间的表达分析

为了研究 CsOSCA 基因家族成员在不同抗旱

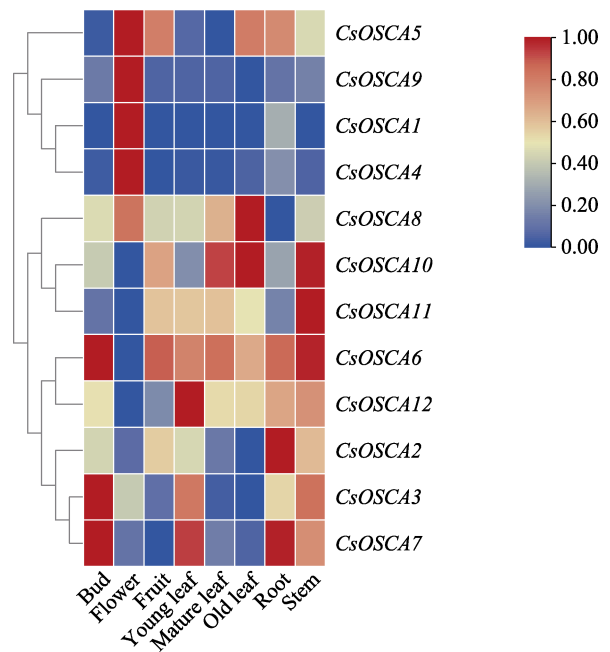
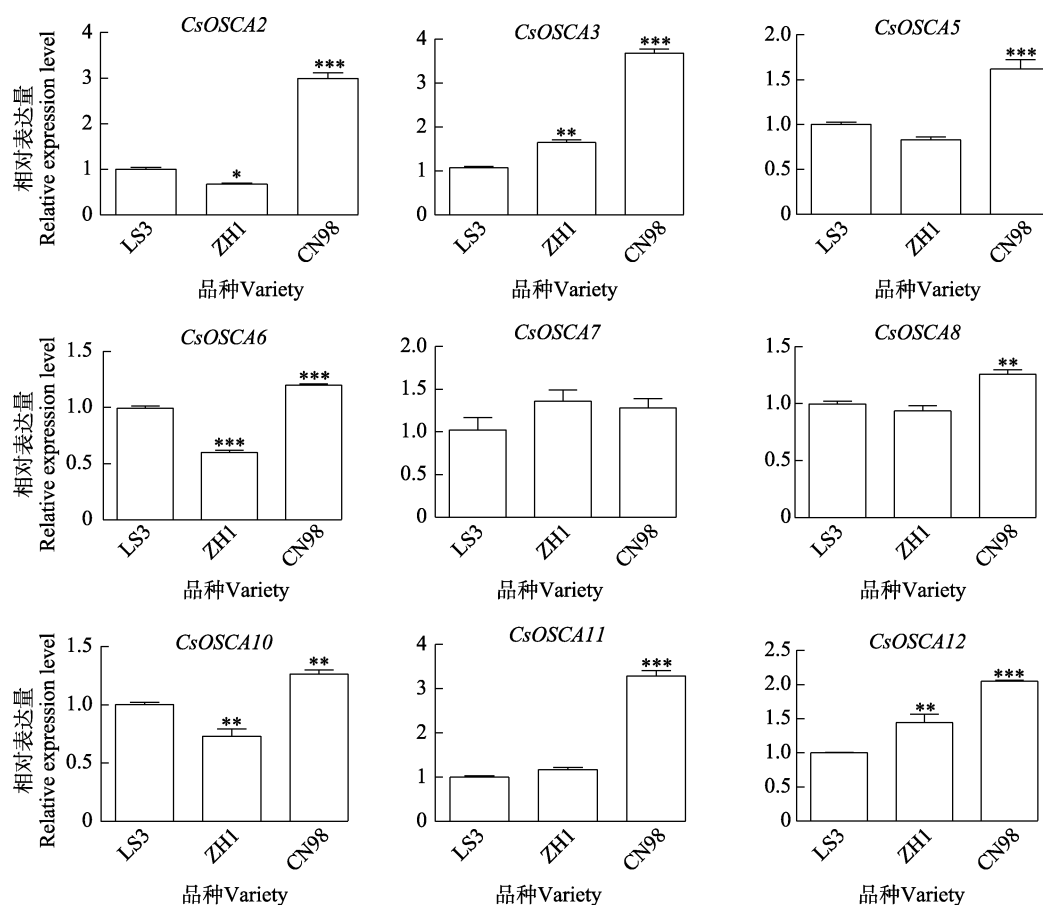


图 5 CsOSCA 基因在不同组织中的表达模式

Fig. 5 Expression patterns of *CsOSCA*s in different tissues

品种间的表达情况，选择抗旱较好的 LS3、ZH1 品种和抗旱较差的 CN98 品种为实验材料，对茶树 *OSCA* 基因家族进行实时荧光定量检测。结果显示，

CsOSCA2、*CsOSCA3*、*CsOSCA11*、*CsOSCA12* 基因在干旱敏感的品种 CN98 中的含量显著高于其他 2 个品种（图 6）。



*表示差异显著 ($P < 0.05$)；**表示差异极显著 ($P < 0.01$)；***表示差异极显著 ($P < 0.0001$)。
 * indicates significant difference ($P < 0.05$); ** indicate extremely significant difference among treatments ($P < 0.01$);
 *** indicates extremely significant difference among treatments ($P < 0.001$).

图 6 *CsOSCA* 基因家族在不同茶树品种中的表达分析

Fig. 6 Expression analysis of *CsOSCA* gene family in different tea cultivars

2.6 *CsOSCA*s 基因干旱胁迫下的表达分析

为了明确茶树 *OSCA* 基因家族成员对干旱胁迫的响应规律，使用 20% PEG-6000 模拟干旱胁迫处理 1 年生舒茶早茶苗，利用 qRT-PCR 分析 *CsOSCA*s 基因的表达情况。如图 7 所示，20% PEG-6000 处理下，1 h 内 *CsOSCA3*、*CsOSCA5*、*CsOSCA8*、*CsOSCA10*、*CsOSCA11*、*CsOSCA12* 表达量明显上调，其中 *CsOSCA3*、*CsOSCA5*、*CsOSCA8*、*CsOSCA10*、*CsOSCA12* 基因在处理 15 min 时表达量显著增加，此时 *CsOSCA10* 基因相对表达量是对照的 3.43 倍。*CsOSCA2* 在 24 h 表达量最高，是对照的 3.92 倍。*CsOSCA3* 和 *CsOSCA12* 表达模式相似，在 12 h 表达量较高，是对照的 2.68 和 4.82 倍，而后表达量降低。

CsOSCA5、*CsOSCA8* 和 *CsOSCA10* 在 PEG-6000 处理后一直维持比较高的表达量。

2.7 茶树 *OSCA* 基因家族启动子顺式元件分析与上游调控转录因子预测

为了研究 *CsOSCA*s 基因对各种信号因子的应答作用，对 *CsOSCA*s 基因启动子上游 1500 bp 序列进行在线分析，发现 *CsOSCA*s 上游启动子存在光周期调控 (photoperiod regulation)、植物激素 (hormones)、生物胁迫 (biotic stress) 和非生物胁迫 (abiotic stress) 相关的元件 (图 8)。光周期调控相关元件包括 3-AF1 binding site、ACE、AE-box、GA-motif、G-box 等 19 种。响应植物激素相关的元件主要有 ABRE、ARE 响应脱落酸；CGTCA-motif、TGACG-motif 响应茉莉酸

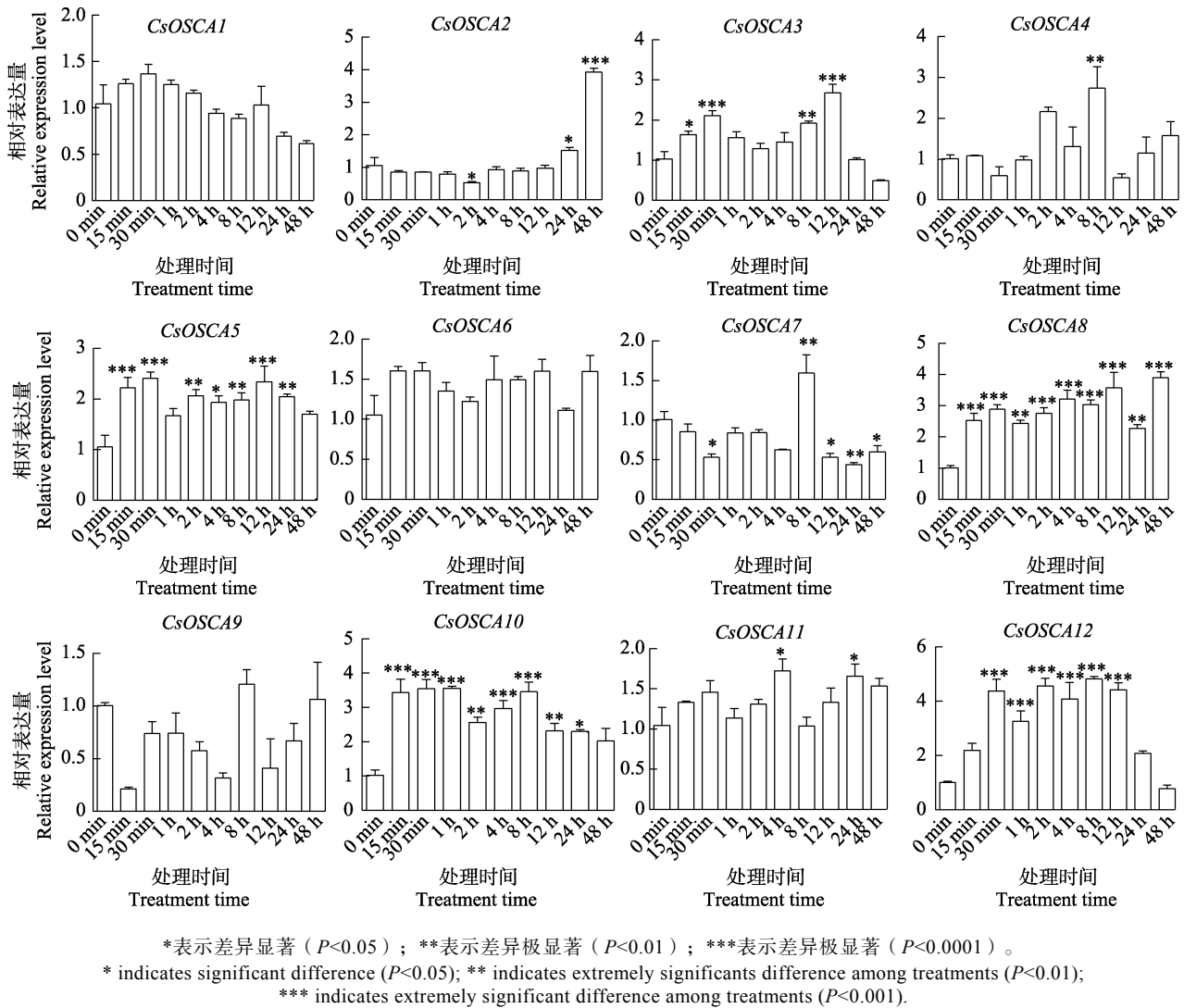


图 7 20% PEG-6000 处理茶树 CsOSCA 的表达分析

Fig. 7 Expression profiles of CsOSCA treated with 20% PEG-6000

甲酯; GARE-motif、P-box、TATC-box 响应赤霉素; TCA-element 响应水杨酸; TGA-element 响应生长素。与生物胁迫相关的元件有: GC-motif 参与缺氧特异性诱导; LTR 响应低温; MBS 干旱诱导; STRE、TCA 响应胁迫诱导。与非生物胁迫相关的元件有 AT-rich element、AT-rich sequence、TC-rich repeats 响应防御与胁迫; W box、WRE3、WUN-motif 响应伤害。在 CsOSCA 中含有最多的顺式作用元件是 ARE 脱落酸响应元件, 大部分的基因都存在 Box 4、G-box、GT1-motif 等光响应元件, 6 个 CsOSCA 含有干旱诱导响应元件。

启动子区域一般富含丰富的顺式作用元件, 通过与反式作用因子结合来调控下游基因的表达。根据干旱胁迫下 CsOSCA 基因家族成员的响应规律, 对于干旱胁迫响应强烈的 CsOSCA2、CsOSCA3、

CsOSCA5、CsOSCA8、CsOSCA10、CsOSCA11、CsOSCA12 基因上游启动子序列可能结合的转录因子进行预测, 并统计出共同的上游调控转录因子 (relative score>0.95) (表 4)。结果显示, DOF 家族成员 AtDOF2.4、AtDOF5.3、AtDOF5.6 和 AtWRKY40 能同时与这 7 个基因的启动子结合。

3 讨论

本研究利用茶树全基因组测序数据信息全面分析 OSCA 基因家族, 共挖掘 12 个 CsOSCA 基因。根据系统进化关系, 茶树 OSCA 基因家族可划分为 4 个亚族, 与小麦^[17]、玉米^[19]、烟草^[16]、绿豆^[20]和梨^[3]等物种研究结果一致。拟南芥中脱水早期反应蛋白 4 (early-responsive to dehydration, ERD4; 即 AtOSCA3.1) 在受到干旱胁迫时会特异

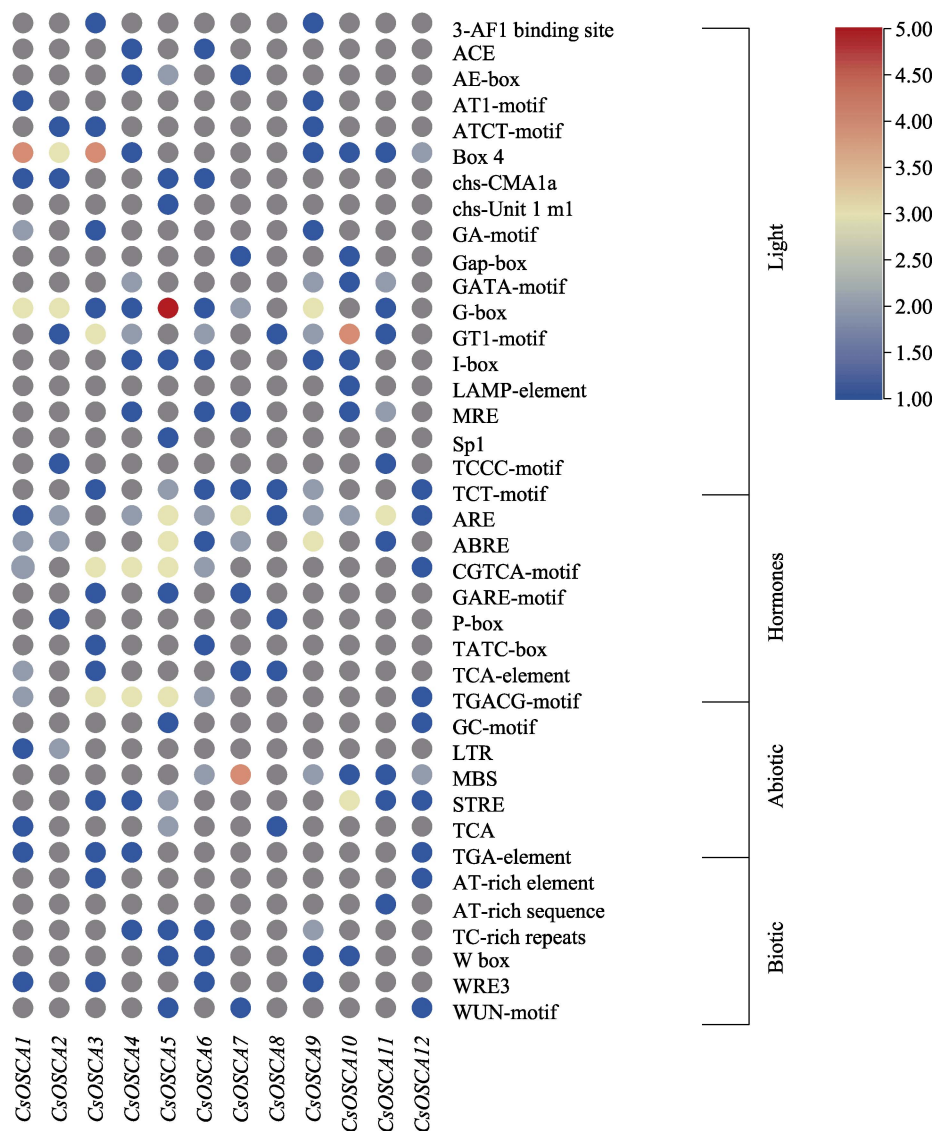


图 8 *CsOSCA*s 顺式作用元件分析
Fig. 8 Cis-acting element analysis of *CsOSCA*s

表 4 *CsOSCA*s 启动子顺式调控元件预测
Tab. 4 Predicted cis-regulatory elements of *CsOSCA*s promoters

名称 Name	基因模型 Gene model	家族 Family	预测序列 Predicted sequence
MA0982.1.DOF2.4	AT2G37590.1	DOF	AAAAAAGT
MA1071.1.DOF5.3	AT5G60200.1	DOF	GAAAAAG
MA0983.1.DOF5.6	AT5G62940.1	DOF	AATAAAGT
MA1085.1.WRKY40	AT1G80840.1	WRKY	AAAGTCAAAA

性启动转录^[21]。本研究, *CsOSCA9* 和 *CsOSCA12* 与 *AtOSCA3.1* 同属 III 亚族, 它们是否参与茶树的干旱胁迫响应机制, 还需进一步研究。

亚细胞定位发现, 茶树 *OSCA* 基因家族成员均定位在质膜上, 与大豆^[22]*OSCA* 基因家族成员相一致。研究表明, *OSCA*s 蛋白序列中存在 11 个 TMs^[7, 23-25], 然而本研究中 *CsOSCA1* 和 *CsOSCA5*

分别包含 9 个和 12 个 TMs, 推测他们在进化过程中可能具有更大的遗传变异。*CsOSCA* 基因家族同一亚族成员外显子数量相近, 而 *CsOSCA5* 外显子数量只有一个, 在水稻^[14]和番茄^[26]中也存在这种单个外显子的情况。*DUF221* 结构域在 *CsOSCA* 基因家族中高度保守, 含有 7 个钙通道跨膜结构域, 命名为 RSN1_7TM^[10]。在分析 *CsOSCA* 基因

家族成员蛋白结构时发现,茶树 *OSCA* 基因家族成员都包含 DUF221 结构域,但是 *CsOSCA5* 有 2 段 DUF221 结构域,保守基序分析也发现 *CsOSCA5* 包含的保守基序比其他基因更少。本研究中,*CsOSCA5* 与 *AtOSCA4.1* 为垂直同源基因对,且 *CsOSCA5* 基因对 PEG 胁迫响应明显,可能 *CsOSCA5* 中的抗逆功能在进化过程中被保留了下来。

本研究中,*CsOSCA*s 基因对 PEG-6000 诱导的干旱胁迫有响应,这与拟南芥^[8]、水稻^[14]、玉米^[19]、小麦^[17]和绿豆^[20]等植物中的研究结果一致。在渗透胁迫下,*CsOSCA2*、*CsOSCA3*、*CsOSCA5*、*CsOSCA8*、*CsOSCA10* 和 *CsOSCA12* 基因显著上调,除了 *CsOSCA2* 以外,其他 5 个基因在 15 min 内均显著上调,推测与 Ca^{2+} 响应速度快有关,其他植物如水稻^[14]、番茄^[26]、玉米^[27]和大豆^[22]*OSCA* 基因家族对干旱胁迫的响应也出现在早期。此外,本研究分析了不同耐旱品种间 *CsOSCA* 基因家族成员在夏季干旱胁迫下的表达差异,发现 *CsOSCA2*、*CsOSCA3*、*CsOSCA11*、*CsOSCA12* 基因在干旱敏感型的茶农 98 中的表达量显著高于其他 2 个抗旱品种,推测这些基因可能在茶农 98 茶树中被诱导表达参与茶树的抗旱反应。*CsOSCA2*、*CsOSCA3*、*CsOSCA12* 不仅在 PEG 处理下诱导表达,在不同品种间表达也存在显著差异,因此 *CsOSCA2*、*CsOSCA3*、*CsOSCA12* 可能是茶树响应干旱胁迫的关键候选基因。

前人研究结果^[14, 26]指出 *OSCA* 基因对 ABA 胁迫反应强烈。本研究对 12 个 *CsOSCA* 基因启动子分析显示,其中 11 个基因启动子含有 ARE 脱落酸响应元件,这些基因是否响应 ABA 胁迫以及干旱胁迫中的 ABA 信号转导值得进一步研究。*CsOSCA6*、*CsOSCA7*、*CsOSCA9*、*CsOSCA10*、*CsOSCA11* 和 *CsOSCA12* 启动子包含干旱诱导响应元件,然而在 PEG 胁迫下只有 *CsOSCA10*、*CsOSCA11* 和 *CsOSCA12* 显著上调。推测 *CsOSCA10*、*CsOSCA11* 和 *CsOSCA12* 在茶树响应干旱胁迫过程中发挥着主要作用。转录因子预测结果显示 DOF 家族成员 *AtDOF2.4*、*AtDOF5.3*、*AtDOF5.6* 和 *AtWRKY40* 可以多数 *CsOSCA*s 基因的启动子结合。有研究指出大部分茶树 *DOFs* 转录因子家族对干旱胁迫有响应^[28-29],推测 *CsDOFs* 转录因子可能参与调控 *CsOSCA* 基因家族响应干旱胁迫产生的信号感受与传导,目前本课题组正在对其

互作关系进行验证。

参考文献

- [1] WANG W, XIN H, WANG M, MA Q, WANG L, KALERI N A, WANG Y, LI X. Transcriptomic analysis reveals the molecular mechanisms of drought-stress-induced decreases in *Camellia sinensis* leaf quality[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7(795): 385.
- [2] ZHOU Y, LIU Y, WANG S, SHI C, ZHANG R, RAO J, WANG X, GU X, WANG Y, LI D. Molecular cloning and characterization of galactinol synthases in *Camellia sinensis* with different responses to biotic and abiotic stressors[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2017, 65(13): 2751.
- [3] GU X, WANG P, LIU Z, WANG L, HUANG Z, ZHANG S, WU J. Genome-wide identification and expression analysis of the *OSCA* gene family in *Pyrus bretschneideri*[J]. *Canadian Journal of Plant Science*, 2018, 94(4): 918-929.
- [4] LIU L, LI Y, SHE G, ZHANG X, JORDAN B, CHEN Q, ZHAO J, WAN X. Metabolite profiling and transcriptomic analyses reveal an essential role of UVR8-mediated signal transduction pathway in regulating flavonoid biosynthesis in tea plants (*Camellia sinensis*) in response to shading[J]. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1): 233.
- [5] ZHANG Q, CAI M, YU X, WANG L, GUO C, MING R, ZHANG J. Transcriptome dynamics of *Camellia sinensis* in response to continuous salinity and drought stress[J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2017, 13(4): 78.
- [6] SAFAEI CHAEIKAR S, MARZVAN S, JAHANGIRZADEH KHAIVI S, RAHIMI M. Changes in growth, biochemical, and chemical characteristics and alteration of the antioxidant defense system in the leaves of tea clones (*Camellia sinensis* L.) under drought stress[J]. *Scientia Horticulturae*, 2020, 265: 109257.
- [7] ZHANG M, WANG D, KANG Y, WU J X, YAO F, PAN C, YAN Z, SONG C, CHEN L. Structure of the mechanosensitive *OSCA* channels[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2018, 25(9): 850-8588.
- [8] YUAN F, YANG H, XUE Y, KONG D, YE R, LI C, ZHANG J, THEPRUNGSIRIKUL L, SHRIFT T, KRICHILSKY B, JOHNSON D M, SWIFT G B, HE Y, SIEDOW J N, PEI Z M. *OSCA1* mediates osmotic-stress-evoked Ca^{2+} increases vital for osmosensing in *Arabidopsis*[J]. *Nature*, 2014, 514(7522): 367-371.
- [9] ZHAI Y, WEN Z, HAN Y, ZHUO W, WANG F, XI C, LIU J, GAO P, ZHAO H, WANG Y, WANG Y, HAN S. Heteroge-

- neous expression of plasma-membrane-localised OsOSCA1.4 complements osmotic sensing based on hyperosmolality and salt stress in *Arabidopsis osca1* mutant[J]. *Cell calcium*, 2020, 91: 102261.
- [10] HOU C, TIAN W, KLEIST T, HE K, GARCIA V, BAI F, HAO Y, LUAN S, LI L. DUF221 proteins are a family of osmosensitive calcium-permeable cation channels conserved across eukaryotes[J]. *Cell Research*, 2014, 24(5): 632-635.
- [11] SUSSMILCH F C, SCHULTZ J, HEDRICH R, ROELFSEMA M R G. Acquiring control: the evolution of stomatal signalling pathways[J]. *Trends Plant Science*, 2019, 24(4): 342-351.
- [12] JEZEK M, BLATT M R. The membrane transport system of the guard cell and its integration for stomatal dynamics[J]. *Plant Physiology*, 2017, 174(2): 487.
- [13] THOR K, JIANG S, MICHARD E, GEORGE J, SCHERZER S, HUANG S, DINDAS J, DERBYSHIRE P, LEITAO N, DEFALCO T A, KOSTER P, HUNTER K, KIMURA S, GRONNIER J, STRANSFELD L, KADOTA Y, BUCHERL C A, CHARPENTIER M, WRZACZEK M, MACLEAN D, OLDROYD G E D, MENKE F L H, ROELFSEMA M R G, HEDRICH R, FEIJO J, ZIPFEL C. The calcium-permeable channel OSCA1.3 regulates plant stomatal immunity[J]. *Nature*, 2020, 585(7826): 569-573.
- [14] LI Y, YUAN F, WEN Z, LI Y, WANG F, ZHU T, ZHUO W, JIN X, WANG Y, ZHAO H, PEI Z M, HAN S. Genome-wide survey and expression analysis of the OSCA gene family in rice[J]. *BMC Plant Biology*, 2015, 15: 261.
- [15] 陶琪. OSCA1 相互作用蛋白及 OSCA 家族成员功能研究[D]. 杭州: 杭州师范大学, 2020.
- TAO Q. Functional studies of OSCA1 interacting proteins and OSCA family members[D]. Hangzhou: Hangzhou Normal University, 2020. (in Chinese)
- [16] 邓智超, 田冬冬, 宋青松, 郭存, 文利超, 王奇, 初雨蒙, 刘涛, 郭永峰. 烟草 OSCA 基因家族鉴定及非生物胁迫诱导表达模式分析[J]. *中国烟草科学*, 2022, 43(1): 14-21.
- DENG Z C, TIAN D D, SONG Q S, GUO C, WEN L C, WANG Q, CHU Y M, LIU T, GUO Y F. Genome wide identification and expression analysis of the OSCA gene family in response to abiotic stresses in tobacco[J]. *Chinese Tobacco Science*, 2022, 43(1): 14-21. (in Chinese)
- [17] TONG K, WU X, HE L, QIU S, LIU S, CAI L, RAO S, CHEN J. Genome-wide identification and expression profile of OSCA gene family members in *Triticum aestivum* L.[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 23(1): 469.
- [18] XIA E H, ZHANG H B, SHENG J, LI K, ZHANG Q J, KIM C, ZHANG Y, LIU Y, ZHU T, LI W, HUANG H, TONG Y, NAN H, SHI C, SHI C, JIANG J J, MAO S Y, JIAO J Y, ZHANG D, ZHAO Y, ZHAO Y J, ZHANG L P, LIU Y L, LIU B Y, YU Y, SHAO S F, NI D J, EICHLER E E, GAO L Z. The tea tree genome provides insights into tea flavor and independent evolution of caffeine biosynthesis[J]. *Molecular Plant*, 2017, 10(6): 866-877.
- [19] DING S, FENG X, DU H, WANG H. Genome-wide analysis of maize OSCA family members and their involvement in drought stress[J]. *PeerJ*, 2019, 7: e6765.
- [20] YIN L, ZHANG M, WU R, CHEN X, LIU F, XING B. Genome-wide analysis of OSCA gene family members in *Vigna radiata* and their involvement in the osmotic response[J]. *BMC plant biology*, 2021, 21(1): 408.
- [21] KIYOSUE T, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. Cloning of cDNAs for genes that are early-responsive to dehydration stress (ERDs) in *Arabidopsis thaliana* L.: identification of three ERDs as HSP cognate genes[J]. *Plant Molecular Biology*, 1994, 25(5): 791-798.
- [22] 李建伟, 杨晔凯, 贾博为, 孙明哲, 刘瑛, 殷奎德, 孙晓丽. 大豆基因组中 OSCA 基因家族的进化及表达分析[J]. *中国油料作物学报*, 2017, 39(5): 589-599.
- LI J W, YANG J K, JIA B W, SUN M Z, LIU Y, YIN K D, SUN X L. Evolution and expression analysis of OSCA gene family in soybean[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2017, 39(5): 589-599. (in Chinese)
- [23] JOJOA-CRUZ S, SAOTOME K, MURTHY S E, TSUI C C A, SANSOM M S, PATAPOUTIAN A, WARD A B. Cryo-EM structure of the mechanically activated ion channel OSCA1.2[J]. *Elife*, 2018, 7: e41845.
- [24] MURTHY S E, DUBIN A E, WHITWAM T, JOJOA-CRUZ S, CAHALAN S M, MOUSAVI S A R, WARD A B, PATAPOUTIAN A. OSCA/TMEM63 are an evolutionarily conserved family of mechanically activated ion channels[J]. *Elife*, 2018, 7: e41844.
- [25] LIU X, WANG J, SUN L. Structure of the hyperosmolality-gated calcium-permeable channel OSCA1.2[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 5060.
- [26] 王傲雪, 张可为, 张瑶, 陈秀玲, 刘佳音. 番茄 OSCA 基因家族鉴定及不同胁迫条件下表达分析[J]. *东北农业大学学报*, 2019, 50(1): 19-28.
- WANG A X, ZHANG K W, ZHANG Y, CHEN X L, LIU J Y. Identification of tomato OSCA gene family and expression analysis under different stress conditions[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2019, 50(1): 19-28. (in Chinese)
- [27] CAO L, ZHANG P, LU X, WANG G, WANG Z, ZHANG Q,

- ZHANG X, WEI X, MEI F, WEI L, WANG T. Systematic analysis of the maize *OSCA* genes revealing ZmOSCA family members involved in osmotic stress and *ZmOSCA2.4* confers enhanced drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(1): 351.
- [28] LI H, HUANG W, LIU Z W, WANG Y X, ZHUANG J. Transcriptome-based analysis of Dof family transcription factors and their responses to abiotic stress in tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. International Journal of Genomics, 2016, 2016: 5614142.
- [29] YU Q, LI C, ZHANG J, TIAN Y, WANG H, ZHANG Y, ZHANG Z, XIANG Q, HAN X, ZHANG L. Genome-wide identification and expression analysis of the Dof gene family under drought stress in tea (*Camellia sinensis*)[J]. PeerJ, 2020, 8: e9269.