

茶树越冬芽萌展期碳氮代谢动态及相关基因分析

吴琼^{1,2}, 刘丹丹¹, 阮旭¹, 沈季雪¹, 徐奕鼎¹, 王文杰^{1*}, 张正竹², 夏恩华²

(1. 安徽省农业科学院茶叶研究所, 合肥 230031;

2. 安徽农业大学省部共建茶树生物学与资源利用国家重点实验室, 合肥 230036)

摘要: 以早生型茶树品种“皖茶4号”(原名红旗1号)为材料, 研究茶树越冬腋芽(Axillary bud, AB)与毗邻成熟叶(下称母叶, Mature leaf, ML)萌展期的碳氮代谢动态变化, 同时根据腋芽全转录组数据分析相关基因的表达情况。结果表明, 不同发育时期的腋芽与母叶中的淀粉、可溶性糖、NSC及糖/淀粉比值差异极显著($P<0.01$); 腋芽与母叶的可溶性蛋白含量差异极显著($P<0.01$); 腋芽中SPS酶活性在3个发育时期差异极显著($P<0.01$), 母叶中SPS、ATP、ALT酶活性在不同发育时期差异极显著($P<0.01$); 通过比较腋芽各生育期的基因表达情况, 发现有8个与碳氮代谢相关的基因表达差异显著($P<0.05$)。

关键词: 茶树; 越冬芽; 碳氮代谢

中图分类号: S571.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2019)04-0559-05

Analysis of dynamic changes of carbon and nitrogen metabolism and related gene expression in overwintering axillary bud during germination period of tea plant(*Camellia sinensis*)

WU Qiong^{1,2}, LIU Dandan¹, RUAN Xu¹, SHEN Jixue¹, XU Yiding¹, WANG Wenjie¹, ZHANG Zhengzhu², XIA Enhua²

(1. Tea Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031;

2. State Key Laboratory of Tea Plant Biology and Utilization, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: The dynamic changes of carbon and nitrogen metabolism in overwintering axillary buds (AB) and adjacent mature leaves (ML) of tea plants during the germination period were detected using the early-generation tea tree variety “Wancha 4” (formerly known as “Hongqi 1”) as the material. The expression of related genes in axillary buds was also analyzed based on the total transcriptome data. The results showed that: from winter dormancy to bud flush stages, the ratios of starch, soluble sugar, NSC and sugar/starch in axillary buds and mature leaves at different developmental stages were extremely significantly different ($P<0.01$); the difference in soluble protein content between axillary buds and mature leaves was extremely significant ($P<0.01$); the activity of SPS in the three developmental stages was extremely significant ($P<0.01$); the activities of SPS, ATP and ALT in the mother leaves were significantly different at different developmental stages ($P<0.01$). It was found that there are significant differences in the expression of 8 genes involved in carbon and nitrogen metabolism ($P<0.05$).

Key words: tea plant; overwintering axillary bud; carbon and nitrogen metabolism

茶树越冬芽的发育进程即第一轮春梢生育期(简称春梢生育期, 下同)是茶树种质资源的鉴定内容之一, 同时也是茶树品种的重要经济性状。近几年来, 由于市场的发展和需求, 名优茶追求“更早、更好”, 因此茶树品种的春梢生育期是新品种选育的一个重要指标。控制越冬茶芽打破休眠、早生

早发受到多种内源遗传因素和环境因素的调节, 但是机制尚未完全清楚^[1]。

王新超以休眠芽和萌动芽为材料, 构建了茶树休眠芽与萌动芽的正、反方向抑制消减杂交文库, 发现休眠芽和萌动芽在基因表达谱上存在差异^[2]。

Hao 等基于内休眠、生理休眠、生态休眠及萌发芽

收稿日期: 2018-10-25

基金项目:安徽省农业科学院人才发展专项(17F0812), 安徽省重点研究与开发项目(1704a07020065), 安徽省农业科学院院所共建团队项目(18C0832)和现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-19)共同资助。

作者简介: 吴琼, 助理研究员。E-mail: wuqiong85@163.com

* 通信作者: 王文杰, 研究员。E-mail: 391590137@qq.com

的转录组的 16 125 条差异基因,对这些基因进行 GO 富集分析及转录因子分析发现,休眠及其解除与表观遗传机制、激素信号途径和愈伤葡聚糖相关的细胞通讯调控相关^[3]。Tarancón 等利用公共数据库中的转录数据,包括拟南芥的休眠芽与萌动芽,葡萄和白杨的腋芽,分析了与内因休眠、相关休眠及生态休眠相关的基因调控网络,认为芽休眠可能是由环境和内源性因素引发的潜伏性碳饥饿症状之一^[4]。丛深等^[5]研究了葡萄芽自然休眠期的呼吸代谢变化,结果表明糖酵解-三羧酸途径是葡萄芽休眠解除的关键因素。施征等认为青海云杉休眠前贮存足够的碳水化合物以保证越冬期间的细胞渗透调节及能量代谢,为新枝条的萌发提供了足够的碳源^[6]。Mason 等监测了八叶期豌豆去掉芽尖前后的腋芽生长素和蔗糖变化,发现糖是植物发育的重要调节剂,是腋芽萌动的必要与充分条件^[7]。

糖既是光合产物,也是呼吸底物,为植物提供了碳骨架和能量^[8]。蛋白质,特别是酶,是几乎所有细胞活动包括碳氮代谢各级反应必不可少的。碳氮代谢必须紧密协作才能使植物维持最佳的生长发育^[9]。

前人利用组学的方法从分子水平上研究了参与茶芽休眠调控的基因,但是对于休眠与萌展期的碳氮代谢变化却没有详细的报道。鉴于此,作者以皖茶 4 号^[10]为试验材料,结合生物信息学手段研究了越冬芽不同发育阶段腋芽的碳氮代谢变化,以期找到茶树越冬芽萌动的内在规律。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料早生省级茶树品种“皖茶 4 号”(原名红旗 1 号),为 7 年生茶树,于 2011 年种植于安徽省农科院茶叶所祁门县箬坑乡品种评比试验园。本试验园有 3 个小区,每个小区为 1 个重复。黄华涛^[11]和杨亚军^[1]对茶树春季新梢伸育时期进行了划分:即冬季营养芽呈休眠状态,为休眠期;春季随着温度的升高,越冬芽芽体膨大至鳞片展开为萌动期。本试验于 2016 年冬季与 2017 年春季采摘每个小区的皖茶 4 号茶树秋梢上处于休眠期、萌动期和 1 芽 1 叶期的腋芽及相邻的成熟叶(下称母叶),液氮速冻后-80℃冰箱保存待用。

1.2 试剂

ELISA 酶联免疫试剂盒购于上海源叶生物科技有限公司,蛋白定量测试盒购于南京建成生物工程研究所,其他试剂均购于国药集团化学试剂有限公

司。

1.3 碳氮代谢相关成分的测定

水分含量的测定参照 GB/T 8304-2013;儿茶素组分含量的测定参照 GB/T 8313-2008;咖啡碱含量的测定参照 GB/T 8312-2013;可溶性糖含量的测定参照张正竹的方法^[12];淀粉含量的测定采用高氯酸法,NSC 为可溶性糖和淀粉含量的总和;可溶性蛋白的测定采用考马斯亮蓝法,所有含量均用干重的百分含量表示。碳氮代谢关键酶的测定,采用酶联免疫的方法,含量用 $U \cdot g^{-1}$ (Pro) 表示。

1.4 转录组测序

将采摘于不同生育期的茶树腋芽使用干冰运输至深圳华大基因有限公司武汉生产中心进行全转录组测序,测序平台为 Illumina HiSeq。

1.5 数据处理

生理生化数据用 SPSS 20.0 统计分析软件处理,对不同生育期的各指标进行单因素方差(ANOVA)分析,采用 Duncan 多重比较。转录组原始数据用 Trimmomatic v0.36 去冗余去接头序列, tophat v2.1.1 比对转录组数据至茶树参考基因组^[13], cufflinks v2.2.1 分析表达差异, blast v2.7.1 比对表达差异基因至拟南芥基因组(<https://www.arabidopsis.org>)。

2 结果与分析

2.1 碳氮代谢变化

2.1.1 非结构性碳水化合物 非结构性碳水化合物(Non-structural carbohydrates, NSC),是植物内生生长、代谢等一系列生理活动的基础能源物质^[8]。本研究分析了越冬芽发育不同时期的腋芽与母叶中的 NSC 含量变化,结果显示不同发育时期的腋芽与母叶中的淀粉、可溶性糖、NSC 及糖/淀粉比值差异极显著($P < 0.01$) (表 1)。随着茶树的发育进程,腋芽淀粉含量逐渐提高,可溶性糖含量在休眠期与萌动期波动不大,在 1 芽 1 叶期迅速升高 50%;母叶中的淀粉略有下降,可溶性糖含量是逐渐上升的,1 芽 1 叶期比萌动期升高 9%。

2.1.2 碳氮代谢关键酶的变化 质膜 ATP 酶(Plasma membrane ATPase)是一种膜蛋白,作为离子泵在细胞代谢过程中起着重要的作用^[14]。谷丙转氨酶(Alanine transaminase, ALT),又称为丙氨基转移酶,在植物氮素同化、蛋白质合成和碳代谢中发挥重要的作用^[15]。蔗糖磷酸合成酶(Sucrose phosphate synthase, SPS)催化蔗糖的合成,是蔗糖进入各种代谢途径必需的关键酶之一,其活力影响光合产物在淀粉与蔗糖之间的分配^[16]。

我们分析了上述 3 个在碳氮代谢中起到关键作用的酶的活性, 结果 (表 2) 表明, 腋芽中 SPS 酶在 3 个发育时期差异极显著 ($P<0.01$), 母叶中 3 个关键酶在不同发育时期差异极显著 ($P<0.01$); 腋芽的 SPS 酶活性随着生育期的进展, 逐渐提高, 而母叶的 SPS 酶活性逐渐降低; 腋芽和母叶的 ATP 酶活性在休眠期均维持在一个较高的水平, 随着生育期的进展, 活性逐渐降低; 萌动期母叶的 ATP 酶活性较之休眠期下降幅度达 86.9%, 在 1 芽 1 叶期略有上升。

腋芽与母叶的可溶性蛋白含量差异极显著 ($P<0.01$), 休眠期的腋芽与母叶的可溶性蛋白含量均在一个较低的水平, 随着发育的进程, 腋芽的可溶性蛋白逐渐升高, 母叶的可溶性蛋白含量在萌动期升高, 进而在 1 芽 1 叶期又下降, 与腋芽的可溶性蛋白含量持平 (表 2)。纵然休眠期的可溶性蛋白含量较低, ATP 酶与 ALT 酶的活力却是 3 个时期中最高的, 所以虽然休眠是肉眼可见的, 但是休眠芽种的生理活动却是非常活跃的。

表 1 茶树不同生育期腋芽与母叶非结构性碳水化合物含量
Table 1 Different contents of NSC between developments of tea plants

组织 Tissue	生育期 Growth period	可溶性糖/% Glucose	淀粉/% Starch	NSC/%	糖淀粉比 Sugar/Starch
腋芽 Axillary bud	休眠期 Dormancy	7.533±0.727 ^A	0.662±0.007 ^A	8.1951±0.080 ^A	11.379±0.009 ^C
	萌动期 Germination	7.368±0.216 ^A	1.024±0.005 ^B	8.391±0.211 ^A	7.198±0.246 ^B
	1 芽 1 叶期 1 leaf 1 bud	11.084±0.012 ^B	2.352±0.176 ^C	13.437±0.165 ^B	4.725±0.359 ^A
母叶 Mature leaf	休眠期 Dormancy	9.231±0.051 ^A	0.810±0.042 ^B	10.041±0.093 ^A	11.417±0.531 ^A
	萌动期 Germination	11.017±0.136 ^B	0.955±0.007 ^C	11.972±0.144 ^B	11.540±0.056 ^A
	1 芽 1 叶期 1 leaf 1 bud	12.029±0.028 ^C	0.553±0.019 ^A	12.583±0.009 ^C	21.740±0.800 ^B

注: 数值为平均值±标准差, 不同大写字母表示不同生育期间的差异显著 (Duncan 多重比较, $P<0.01$)。下同。

Note: Values are expressed as mean ± standard deviation. Different capital letters in each column indicated significant different between developments (Duncan multiple comparisons, $P<0.01$). The same below.

表 2 茶树不同生育期可溶性蛋白与碳氮关键酶活性
Table 2 Concentration of soluble protein and the activity of key enzymes during germination period

组织 Tissue	生育期 Growth period	可溶性蛋白/% Soluble protein	ATP 酶/ $U \cdot g^{-1}$	ALT 酶/ $U \cdot g^{-1}$	SPS 酶/ $U \cdot g^{-1}$
腋芽 Axillary bud	休眠期 Dormancy	1.238±0.006 ^A	13.579±5.62 ^A	10.358±2.051 ^A	0.886±0.065 ^A
	萌动期 Germination	1.913±0.060 ^B	5.256±0.961 ^A	6.372±0.444 ^A	2.057±0.064 ^B
	1 芽 1 叶期 1 leaf 1 bud	4.051±0.189 ^C	4.389±0.156 ^A	7.715±0.409 ^A	4.235±0.041 ^C
母叶 Mature leaf	休眠期 Dormancy	1.265±0.034 ^A	26.191±5.543 ^B	31.521±7.015 ^B	2.795±0.041 ^B
	萌动期 Germination	6.043±0.555 ^B	3.440±0.588 ^A	2.429±0.426 ^A	0.366±0.184 ^A
	1 芽 1 叶期 1 leaf 1 bud	4.511±0.032 ^B	5.638±0.427 ^A	2.496±0.155 ^A	0.402±0.014 ^A

表 3 茶树不同生育期腋芽转录组数据质量报告
Table 3 Quality report of the transcriptomes data of axillary buds

样本 Sample	Clean Reads	Clean bases	Read length/ bp	Q20/%	GC/%
休眠期 Rep1 Dormancy Rep1	60 166 166	9 024 924 900	150	98.48	44.40
休眠期 Rep2 Dormancy Rep2	60 896 494	9 134 474 100	150	98.33	44.27
休眠期 Rep3 Dormancy Rep3	60 690 512	9 103 576 800	150	98.43	43.91
萌动期 Rep1 Germination Rep1	60 094 034	9 014 105 100	150	98.30	44.88
萌动期 Rep2 Germination Rep	61 182 078	9 177 311 700	150	98.35	44.90
萌动期 Rep3 Germination Rep3	60 915 310	9 137 296 500	150	98.43	45.16
1 芽 1 叶期 Rep1 1 leaf 1 bud Rep1	61 182 828	9 177 424 200	150	98.51	45.55
1 芽 1 叶期 Rep2 1 leaf 1 bud Rep2	60 202 912	9 030 436 800	150	98.37	45.48
1 芽 1 叶期 Rep3 1 leaf 1 bud Rep3	60 185 200	9 027 780 000	150	98.33	45.56

2.2 碳氮代谢关键酶编码基因表达分析

我们分析了不同生育期腋芽的全转录组数据,

数据质量报告见表 3。通过比较各生育期的基因表达情况, 一共筛选出 961 条差异表达基因 ($P<0.05$)。

将这些差异表达基因与拟南芥的基因组进行比对,在茶树基因组数据库 (<http://tpia.teaplant.org>) 上进行基因功能查询,结果发现有 8 个与碳氮代谢相关的基因表达差异显著(7 个编码 ATP 酶家族基因: *TEA005087*、*TEA006851*、*TEA014096*、*TEA016662*、*TEA016722*、*TEA025126*、*TEA029704*, 1 个编码 SPS 酶基因: *TEA030791*) (表 4)。在本研究中,我们发现基因 *TEA029704* 在休眠期时高表达,随着发育的进程,表达量逐渐降低。基因 *TEA029704* 与 *AT3G21180* 相似性高达 93.103%, KEGG 通路分析

其为编码 Ca^{2+} -ATP 酶的基因; *TEA016722* 与 *TEA006851* 在休眠期低表达,在 1 芽 1 叶期高表达。基因 *TEA016722* 与 *AT2G34660* 相似性为 59%, KEGG 通路分析为编码热激蛋白基因; 基因 *TEA006851* 随着发育的进程,表达逐渐降低,与 *AT3G12580* 相似性为 93.739%, KEGG 通路分析显示其为编码 ATP 依赖的蛋白水解酶基因。基因 *TEA030791* 与 *AT1G04920* 相似性达 73.166%, KEGG 通路分析显示其为编码蔗糖磷酸合成酶基因。

表 4 茶树腋芽不同发育期碳氮代谢相关基因

Table 4 The expression level of related genes involved in carbon and nitrogen metabolism

基因 ID Gene ID	Blast searches (Araport11 genome)	相似性/% Similarity	基因表达谱 Gene expression profile
<i>TEA005087</i>	<i>AT5G27000</i>	66.047	
<i>TEA006851</i>	<i>AT1G74310</i>	87.343	
<i>TEA014096</i>	<i>AT4G38510</i>	92.083	
<i>TEA016662</i>	<i>AT2G34660</i>	59.000	
<i>TEA016722</i>	<i>AT3G12580</i>	92.739	
<i>TEA025126</i>	<i>AT1G06430</i>	76.697	
<i>TEA029704</i>	<i>AT3G21180</i>	93.103	
<i>TEA030791</i>	<i>AT1G04920</i>	73.166	

注: 热图中的颜色代表了基因在样品中的表达量水平, 表达量水平以 $\log_2(\text{FPKM}+1)$ 衡量, 颜色从浅到深, 表示基因表达量越高。

Note: The color of heatmap indicates the expression level of genes. The level of expression is measured by $\log_2(\text{FPKM}+1)$. Colors from white to black indicate a gradual increase in gene expression level.

3 讨论

芽休眠的转换过程伴随着一系列的生理生化变化, 包括但不限于水分代谢、钙离子信号转导, 激素、糖类、过氧化物酶系、碳氮代谢酶类等; 这样的转化过程也是一系列基因及分子参与调控的过程, 它们共同作用并影响芽的休眠进程。糖的源-库转运是植物生长的主要决定因素之一, 糖作为光合作用的主要产物, 既是生物体生命活动的能量来源, 也是生物体发育的信号物质^[17]。本研究表明茶树越冬芽在“休眠-萌动-伸展”的发育进程中, 芽与母叶的非结构性碳水含量逐渐达到平衡, 这种变化是符合“源库”理论的。在冬季, 茶树的成熟叶片与越冬芽是源与库的关系, 成熟叶生产同化物并向越冬芽提供营养, 随着休眠的破除, 越冬芽渐渐的伸展, 二者源与库的地位慢慢发生改变; 当发育中的叶片伸展到最终大小的一半时, 其输入的有机物质减少, 输出的物质增多, 其同时具有源和库的作用^[18]。在休眠期, 茶树越冬芽中的 SPS 酶活性随

着发育的进程逐渐升高, 这与可溶性糖含量的增高趋势是一致的。 Ca^{2+} 是细胞分裂的重要调控因子, 参与芽休眠的调控, 已有研究证明 Ca^{2+} -ATPase 在植物生长发育及对外界逆境胁迫的应答中发挥重要作用。本研究发现有一系列编码 ATP 酶基因家族的表达量有显著差异, 特别是其中编码 Ca^{2+} -ATPase 基因, 在休眠时高表达, 而在萌展期低表达, 这也是对前人研究的结果, 即 Ca^{2+} 是传递自然低温信号的信使在休眠过程中起重要作用的一个有力佐证^[19-20]。

参考文献:

- [1] 杨亚军. 中国茶树栽培学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005.
- [2] 王新超. 茶树越冬芽休眠与萌发相关基因的分离与表达分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.
- [3] HAO X Y, YANG Y J, YUE C, et al. Comprehensive transcriptome analyses reveal differential gene expression profiles of *Camellia sinensis* axillary buds at Para-, endo-, ecodormancy, and bud flush stages[J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 553.
- [4] TARANCÓN C, GONZÁLEZ-GRANDÍO E, OLIVEROS J C, et al. A conserved carbon starvation response under-

- lies bud dormancy in woody and herbaceous species[J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 788.
- [5] 丛深, 王海波, 王孝娣, 等. 葡萄芽自然休眠期间的呼吸代谢变化[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(6): 1201-1207.
- [6] 施征, 白登忠, 张维诚, 等. 青海云杉休眠前后非结构性碳水化合物含量随海拔变化[J]. *林业科学研究*, 2017, 30(6): 908-915.
- [7] MASON M G, ROSS J J, BABST B A, et al. Sugar demand, not auxin, is the initial regulator of apical dominance[J]. *PNAS*, 2014, 111(16): 6092-6097.
- [8] 李婷婷, 薛璟祺, 王顺利, 等. 植物非结构性碳水化合物代谢及体内转运研究进展[J]. *植物生理学报*, 2018, 54(1): 25-35.
- [9] ZHENG Z L. Carbon and nitrogen nutrient balance signaling in plants[J]. *Plant Signal Behav*, 2009, 4(7): 584-591.
- [10] 王文杰, 鲍新民, 方吴云, 等. 茶树新品种皖茶 4 号与皖茶 5 号选育研究[J]. *茶业通报*, 2018, 40(1): 32-36.
- [11] 黄华涛. 茶树越冬芽形态结构与春梢伸育关系的初步观察[J]. *广东茶叶科技*, 1986(1): 22-27.
- [12] 张正竹. 茶叶生物化学实验教程[M]. 北京: 中国农业出版社, 2009.
- [13] 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]. *PNAS*, 2018, 115(18): E4151-E4158.
- [14] 刘艳, 黄卫东, 陈贵林, 等. 质膜 ATP 酶介导机械伤害诱导豌豆叶片的防御反应[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(16): 3411-3417.
- [15] 崔新, 刘志薇, 吴致君, 等. 茶树谷丙转氨酶基因的克隆及其表达分析[J]. *西北植物学报*, 2016, 36(12): 2361-2369.
- [16] 刘炳清, 许嘉阳, 黄化刚, 等. 不同海拔下烤烟碳氮代谢相关酶基因的表达差异分析[J]. *植物生理学报*, 2015, 51(2): 183-188.
- [17] 王武, 孙龙, 陶建敏. 多年生植物芽休眠研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(8): 6-10.
- [18] 王衍安, 龚维红. 植物与植物生理[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004.
- [19] 王海波, 王孝娣, 程存刚, 等. 桃芽休眠的自然诱导因子及钙在休眠诱导中的作用[J]. *应用生态学报*, 2008, 19(11): 2333-2338.
- [20] 谭钺, 高东升, 李玲, 等. 油桃花芽破眠过程中 H_2O_2 代谢与 Ca^{2+} 转运的关系[J]. *应用生态学报*, 2015, 26(2): 425-429.