

## 油茶*ABI5*基因的克隆及其表达分析

杨进, 周俊琴, 卢梦琪, 余姝姝, 刘懿瑶, 谭晓风\*

中南林业科技大学, 经济林培育与保护教育部重点实验室, 经济林育种与栽培国家林业局重点实验室, 经济林培育与利用湖南省2011协同创新中心, 长沙410004

**摘要:** 以油茶(*Camellia oleifera*)主栽品种‘华硕’为试验材料, 通过RT-PCR的方法克隆出油茶脱落酸不敏感蛋白5 (abscisic acid-insensitive 5, *ABI5*)全长cDNA序列, 命名为*CoABI5*, 利用不同的在线网站对*CoABI5*基因进行生物信息学分析, 通过原核表达、亚细胞定位和实时荧光定量PCR分别对该基因的表达情况、表达部位和表达模式进行研究分析。结果表明: 该序列CDS长度为795 bp, 编码264个氨基酸, 其中与茶树(*Camellia sinensis*)的*ABI5*相似性最高, 达到97.73%。原核表达实验发现融合蛋白pCold-*CoABI5*-TF在37°C诱导4 h后, 在85 kDa处出现一条蛋白条带, 与理论融合蛋白的分子量一致。亚细胞定位显示该基因定位于细胞核。实时荧光定量PCR结果表明, *CoABI5*基因在油茶花粉中的表达量最高, 自交24 h花柱中的表达量大于‘华硕’×‘华鑫’异交, 异交48 h子房中的表达量大于自交。本研究对进一步挖掘该基因在油茶后期自交不亲和过程中发挥的作用提供研究基础, 对油茶自交不亲和分子机制解析具有重要的意义。

**关键词:** 油茶; 自交不亲和; *ABI5*基因; 原核表达; 亚细胞定位; 表达模式

油茶(*Camellia oleifera*)属山茶科山茶属, 是中国南方最重要的木本食用油料树种(赵广等2017)。然而在油茶生产中存在花多果少、坐果率低的现象(袁德义等2011)。先前有研究报道, 油茶自交花粉管可以进入到子房中, 但不能进入胚珠, 进而不能形成受精卵, 表明油茶可能具有自交不亲和的特性(高超等2015)。自交不亲和性(self-incompatibility, SI)是指雌雄配子均有正常的生活受精能力, 在不同的基因型株间授粉能正常结实, 但花期自交不能结实或结实率极低的特性(Wheeler等2009)。植物生长调节因子在植物花粉萌发、花粉管生长、授粉受精等生殖发育过程中起着重要作用(张绍铃等2003)。Baker等(1997)研究发现可可(*Theobroma cacao*)的自交授粉花朵中脱落酸(abscisic acid, ABA)的含量增加, 在矮牵牛(*Petunia hybrida*)中也发现了类似的规律(Kovaleva等2003), 因此推测ABA可能与植物的SI反应有关。

Finkelstein等(2000)借助遗传学和分子生物学手段鉴定得到了一系列与ABA响应相关的成员, 如*ABI1* (abscisic acid-insensitive 1)、*ABI2*、*ABI3*、*ABI4*、*ABI5*。其中, *ABI1*和*ABI2*均属于蛋白磷酸激酶2C (protein phosphokinase 2C, PP2C) (Schweighofer等2014), *ABI3*、*ABI4*和*ABI5*均属于碱性亮氨酸拉链类(basic leucine zipper, bZIP)转录因子,

ABA可以诱导*ABI5*表达, 使蛋白稳定并且处于磷酸化的状态(燕芳2012)。大量的研究表明, *ABI5*分别在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的种子休眠和萌发(Ibarra等2016)、植物的生长发育(Yang等2016)、植物对逆境胁迫的响应(Liao等2016)、花青素的积累(Hoth等2010)等生命过程中起着重要作用。染色质免疫沉淀实验发现*ABI5*通过结合到花发育基因*FLC* (*flowering locus C*)的启动子元件, 进而激活*FLC*的表达, 参与植物的花发育过程(任静静2018)。

近年来, 在水稻(*Oryza sativa*) (Zou等2008)、小麦(*Triticum aestivum*) (孙晓燕2016)、玉米(*Zea mays*) (燕芳2012)等农作物中克隆获得了*ABI5*基因, 然而, 关于油茶*ABI5*基因的研究尚未报道过。为解析油茶后期自交不亲和的分子机理, 构建了油茶自交和异交的雌蕊转录组数据库(余姝姝等2019), 从油茶雌蕊转录组数据库中, 筛选出一条在自、异交处理中存在显著表达差异的*CoABI5*基因。为探究*CoABI5*在自交不亲和中的具体作用, 以油茶‘华硕’ (谭晓风等2011)为试验材料, 分离克隆了

收稿 2020-02-12 修定 2020-05-30  
资助 国家自然科学基金重点项目(31730016)。  
\* 通讯作者(tanxiaofengcn@126.com)。

*CoABI5*, 通过研究原核表达、亚细胞定位以及表达模式等, 为阐明油茶自交不亲和反应机理提供理论基础, 促进油茶遗传学研究, 对油茶杂交育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

本研究以国家审定的油茶(*Camellia oleifera* Abel)品种‘华硕’和‘华鑫’(谭晓风等2012; 吴方圆等2018)为研究对象, 以‘华硕’作为母本进行了自交、异交和未授粉3个处理, 采集8个不同组织(子房、花柱、叶芽、花丝、花粉、花瓣、花药、茎)和每个处理下各个时间段(授粉后2、12、24、36、48、54、60、66、72、84 h)的花柱、子房为研究材料。样品采摘后立即用锡箔纸包好放入液氮中带回实验室, 置于-80℃的超低温冰箱中保存备用。样品采自湖南省长沙市望城区中南林业科技大学油茶试验基地, 授粉时间为2018年11月20日~12月1日。

1.1.2 试剂

2×Taq Master Mix普通DNA聚合酶、5′min™ TA/Blunt载体、大肠杆菌DH5α、*E. coli* Star (DE3)感受态细胞购自诺唯赞生物科技有限公司; Prime-STAR HS DNA Polymerase高保真DNA聚合酶购自Takara公司; 胶回收试剂盒Gel Extaction Kit购自Omega公司; 引物合成及测序均由擎科生物公司完成。其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 总RNA的提取及cDNA的合成

油茶‘华硕’8个组织和自交、异交和未授粉处理下的花柱和子房总RNA的提取按照Omega试剂盒说明书进行。用1%的琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性, 以Oligo (T)为引物, 按照Vazyme公司的荧光定量逆转录试剂盒说明书合成油茶cDNA的第一条链。

1.2.2 *CoABI5*基因克隆

根据油茶雌蕊转录组数据分析, 得到长度为795 bp的*ABI5*基因片段, 通过NCBI Blastx网站上对*CoABI5*的基因片段进行检索和分析, 发现*CoABI5*蛋白与茶树*ABI5*相似性达到97.73%, 因此推测*ABI5*基因片段为油茶的全长序列。利用Primer Premier 5.0软件设计一对全长引物*CoABI5*-F和*CoABI5*-R (表1)。以自交48 h子房总RNA逆转录得到的cDNA为模板, 用Takara公司PrimeSTAR HS DNA Polymerase高保真DNA聚合酶进行PCR扩增, 反应体系和扩增程序详见说明书。回收全长cDNA扩增片段, 与载体5′min™ TA/Blunt进行连接, 转化大肠杆菌DH5α感受态细胞, 挑选阳性克隆样品送去擎科生物公司进行测序。

1.2.3 *CoABI5*基因的生物信息学分析

在NCBI BlastX网站上对测序结果进行检索和分析, 利用本地软件Vector NTI 10.3.0和GeneDoc对序列进行比对分析和翻译, 用MEGA 7.1软件对多个物种的蛋白质序列进行比对并构建系统树。利用在线软件ProtParam (<http://web.expasy.org/>

表1 引物信息  
Table 1 Primers used in this study

| 引物名称         | 引物序列(5′→3′)                                   | 用途           |
|--------------|-----------------------------------------------|--------------|
| CoABI5-F     | ATGGGGATTTCAGACAATGGGTTC                      | cDNA扩增       |
| CoABI5-R     | TCAGAAAGAACTCGTTCTTCGAA                       |              |
| CoABI5-TF-F  | ACCCTCGAGGGATCCGAATTCATGGGGATTTCAGACAATGGGTTC | 原核表达扩增       |
| CoABI5-TF-R  | CTATCTAGACTGCAGGTCGACTCAGAAAGAACTCGTTCTTCGAAG |              |
| CoABI5-GFP-F | CAAGAGACAGGATCCGAATTCATGGGGATTTCAGACAATGGGTTC | 亚细胞定位扩增      |
| CoABI5-GFP-R | CATCGGTGCACTAGTGTGCAGCAAAGAACTCGTTCTTCGAAGCTG |              |
| CoABI5-QF    | ACAGCCTCATCTACAGCCATTT                        | 实时荧光定量RT-PCR |
| CoABI5-QR    | AGAAGAACTATCGGTGTCCATT                        |              |

protParam/), TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>), NetPhos 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>), ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>)分别分析油茶ABI5蛋白的理化性质、跨膜结构、信号肽、磷酸化位点、亲疏水性蛋白等。利用在线软件SOPMA ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=NPSA/npsa\\_sopma.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_sopma.html))预测分析蛋白质的二级结构。预测亚细胞定位使用在线软件SubLoc (<http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc/>)、Plant-mPLOC Server (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>)和WoLF PSORT (<http://wolfpsort.seq.cbrc.jp>)。

#### 1.2.4 *CoABI5*基因的原核表达

根据*CoABI5*全长测序结果, 利用同源重组的原理构建原核表达载体pCold-CoABI5-TF。利用引物CoABI5-TF-F和CoABI5-TF-R (表1), 和Takara公司PrimeSTAR HS DNA Polymerase 高保真DNA聚合酶进行PCR扩增(图1-B), 利用*EcoRI*和*SalI*两种限制性内切酶对线性化载体pCold-TF进行双酶切, 将*CoABI5*基因DNA回收片段与pCold-TF质粒连接, 转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞, 挑取阳性单克隆菌落进行测序。

将重组载体pCold-CoABI5-TF和pCold-TF (作为对照)通过热激法转化大肠杆菌E.coli Star (DE3)感受态细胞。挑选3个阳性单克隆菌落, 接种至2~3 mL含氨苄的LB液体培养基中, 37°C 200 r·min<sup>-1</sup>培养12 h。待培养完成后对菌液进行PCR扩增, 检测阳性菌株。取200  $\mu$ L的菌液加入到1 800  $\mu$ L含氨苄的LB液体培养基, 37°C振荡培养至OD<sub>600</sub>为0.5~0.8。pCold-TF和pCold-CoABI5-TF的菌液中加入IPTG诱导, 终浓度梯度为: 0、0.5、0、0.5、0.8、1.0、1.3、1.7、2.0 mmol·L<sup>-1</sup>, 37°C 200 r·min<sup>-1</sup>诱导培养4 h, 8 000×g离心2 min, 弃上清, 在菌体沉淀中加入5×蛋白上样缓冲液(60  $\mu$ L)和无菌水(240  $\mu$ L), 100°C煮沸10 min, 立即置于冰上2 min, 鉴定蛋白纯度使用SDS-PAGE电泳。

#### 1.2.5 *CoABI5*基因的亚细胞定位

为研究*CoABI5*亚细胞定位, 利用同源重组的原理设计引物CoABI5-GFP-F和CoABI5-GFP-R (表1), 以*CoABI5*质粒为模板进行扩增(图1-C), 选择*EcoRI*和*SalI*双酶切位点在含有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的表达载体(pCAMB1300-35S-GFP)上插入*CoABI5*基因, 使用电击法将重组载体转化至GV3101农杆菌中。挑取3个菌落接种到含(Rif、Gen、Kan)的LB液体培养基中, 培养完成后进行PCR菌液检测。用含有1/2

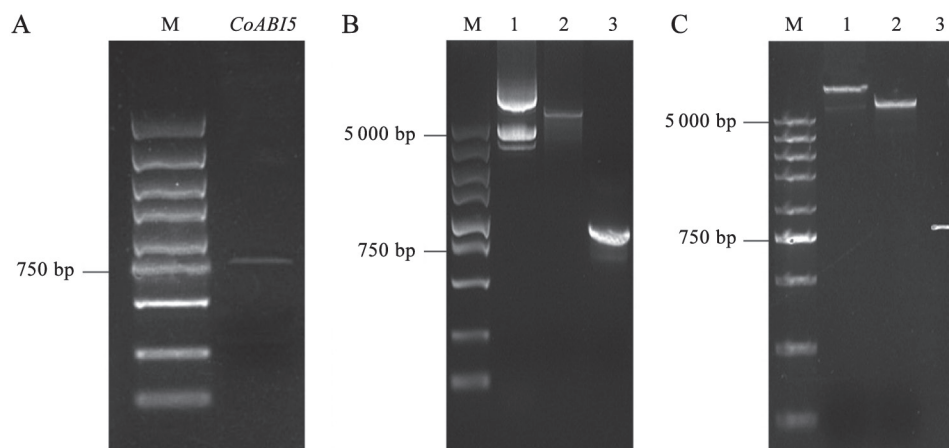


图1 *CoABI5*基因克隆及载体构建

Fig.1 Cloning and vector construction of *CoABI5*

A: *CoABI5*基因全长扩增片段; B: *CoABI5*基因的原核表达载体构建; B图中1: 载体pCold-TF; 2: 线性化载体pCold-TF; 3: 扩增产物pCold-CoABI5-TF; C: *CoABI5*基因的亚细胞定位载体构建; C图中1: 载体pCAMB1300-35S-GFP; 2: 线性化载体pCAMB1300-35S-GFP; 3: 扩增产物pCAMB1300-35S-CoABI5-GFP。

MS、10 mmol·L<sup>-1</sup> MES (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O)、150 μg·mL<sup>-1</sup> 乙酰丁香酮的渗透液重悬。采用农杆菌侵染法将带有*CoABI5*基因的农杆菌注射本式烟草叶片下表皮细胞中(刘美兰2015), 暗培养3 h后光照培养2 d, 在LSM510激光共聚焦显微镜下观察, GFP激发波长为488 nm, 发射波长为495~545 nm, 利用4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole)对细胞核进行染色。

### 1.2.6 实时荧光定量PCR

为了检测该基因在油茶不同组织和自交、异交和未授粉处理下花柱和子房的表达模式, 设计*CoABI5*基因的实时荧光定量引物CoABI5-QF和CoABI5-QR (表1), 扩增长度为184 bp。琼脂糖凝胶电泳检测表明, CoABI5-QF和CoABI5-QR扩增出预期片段, 没有引物二聚体。以油茶*GAPDH*为内参基因, 每个反应进行3次重复。实时荧光定量PCR (real-time quantitative PCR, qPCR)使用CFX96 Real-time PCR反应系统。反应体系和扩增程序详见说明书。相对表达量数据分析采用2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup>法(Livak等2001)。

### 1.2.7 数据分析

采用Origin 2019软件进行数据处理和制作图表。采用SPSS 24.0软件的邓肯法多重比较试验进行数据显著性分析, 各柱形图上用不同小写字母标识表示数据间差异显著( $P < 0.05$ )。

## 2 实验结果

### 2.1 *CoABI5*基因的结构特点

从油茶雌蕊转录组数据中获得的*ABI5*基因的CDS序列, PCR产物经回收、连接转化后, 进行测序。测序后的序列与转录组数据一致, 长度为795 bp (图1-A), 编码264个氨基酸。利用在线软件ProtParam对CoABI5蛋白序列进行理化性质分析, 结果表明: CoABI5蛋白的相对分子量为29.7 kDa, 理论等电点pI为7.84, 分子式: C<sub>1278</sub>H<sub>2077</sub>N<sub>385</sub>O<sub>413</sub>S<sub>8</sub>; 脂肪系数为75.42, 总平均亲水性为-0.753, 该蛋白为亲水性蛋白; CoABI5含酸性氨基酸(Asp+Glu) 36个, 含碱性氨基酸(Arg+Lys) 37个, 不稳定系数计算为55.16, 为不稳定蛋白。CoABI5的二级结构中含有α-螺旋11个(43.56%)、延伸链18个(6.82%)、β-折

叠5个(1.89%)和不规则卷曲126个(47.73%)。信号肽结果显示, CoABI5不含信号肽, 该蛋白为非分泌蛋白。跨膜结构预测结果显示, 该蛋白不含跨膜结构域, 为原核表达试验奠定基础。此外, CoABI5蛋白含有21个丝氨酸磷酸化位点, 5个苏氨酸磷酸化位点, 2个酪氨酸磷酸化位点(图2)。

将克隆得到的油茶*ABI5*基因的氨基酸序列与其他物种的*ABI5*基因的氨基酸序列通过NCBI Protein Blast、Genedoc和Vector NTI 10.3.0进行同源性分析(图2), 结果显示: 油茶ABI5与多个物种的ABI5的相似性达到60%~98%, 其中与茶树、可可、咖啡(*Coffea arabica*)的相似性分别为97.73%、70.68%、71.05%。使用MEGA 7.1软件的邻接法对油茶、茶树、榴莲(*Durio zibethinus*)、可可、麻风树(*Jatropha curcas*)、核桃(*Juglans regia*)、枣(*Ziziphus jujuba*)、大豆(*Glycine max*)、棉花(*Gossypium hirsutum*)、巴西橡胶(*Hevea brasiliensis*)等多个物种进行多序列比对并构建进化树(图3), 结果表明: 油茶ABI5与茶树ABI5聚类在同一小枝上, 亲缘关系最近, 与比对结果一致。

### 2.2 *CoABI5*基因的原核表达

通过*EcoRI*和*SaII*双酶切, 将*CoABI5*基因连接至pCold-TF表达载体上, 获得重组载体pCold-CoABI5-TF, 将空载pCold-TF与重组载体pCold-CoABI5-TF的菌液裂解后进行SDS-PAGE表达蛋白的电泳分析(图4)。结果表明: pCold-TF载体的His标签大小为55 kDa, CoABI5蛋白分子量为29.7 kDa。空载pCold-TF在IPTG浓度为0.5 mmol·L<sup>-1</sup>时表达量最高; 重组载体pCold-CoABI5-TF在IPTG不同浓度诱导下都出现了一条约85 kDa的蛋白条带, 与理论融合蛋白的分子量一致, 表明*CoABI5*基因在大肠杆菌中成功表达。另外, 目的蛋白在IPTG浓度为0.8 mmol·L<sup>-1</sup>时表达量最高。含空载pCold-TF和重组载体pCold-CoABI5-TF在IPTG浓度为0 mmol·L<sup>-1</sup>的菌株中均未出现相应的蛋白条带。

### 2.3 *CoABI5*基因的亚细胞定位

利用在线软件SubLoc、Plant-mPLoc和WoLFPSORT预测CoABI5蛋白定位于细胞核。将*CoABI5*基因与pCAMIB1300-35S-GFP进行连接, 获得重组载体pCAMIB1300-35S-CoABI5-GFP。将带

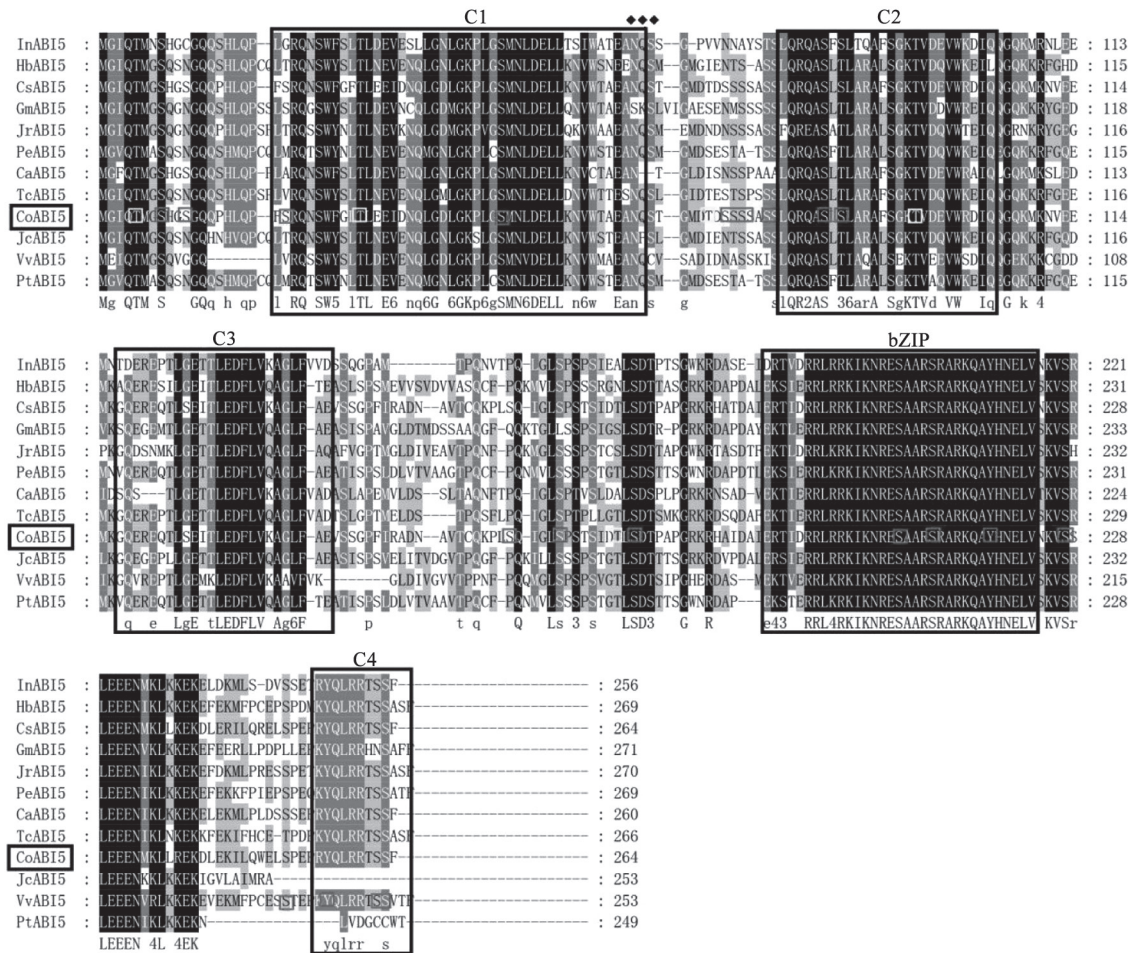


图2 CoABI5与同源ABI5的氨基酸序列比对

Fig.2 Comparison of deduced amino acid sequences of CoABI5 with ABI5s from other species

C1~C4表示4个保守结构域; bZIP表示结构域; □表示蛋白激酶磷酸化位点; ◆表示N-糖基化位点。

有*CoABI5*基因的农杆菌注射到本式烟草叶片中, 置于激光共聚焦显微镜下观察GFP的信号。发现该融合蛋白的GFP荧光信号在细胞核中(图5-A), 通过白光(图5-B)、DAPI荧光(图5-C)进行共定位, 发现定位完全一致(图5-D), *CoABI5*定位于细胞核中, 这一结果与生物信息学预测结果相同。

## 2.4 *CoABI5*基因在油茶树体中的表达模式

采用实时荧光定量PCR对*CoABI5*基因在油茶不同组织中的表达量进行数据分析, 结果表明:*CoABI5*基因在各个组织中均有表达, 在花粉中表达量最高(图6)。

对*CoABI5*基因在油茶自交、异交和未授粉处理下的花柱和子房中的表达量进行数据分析, 结

果显示: *CoABI5*基因在各个处理下的花柱和子房均有表达, 但存在差异。其中*CoABI5*基因在自交、异交花柱的表达量随着授粉时间的增加呈现波浪状趋势, 在自交授粉24 h达到最大值, 异交授粉36 h达到最大值; 未授粉花柱的表达量随着授粉时间的增加呈先下降再上升的趋势, 在授粉2 h达到最大值。*CoABI5*基因在自交、异交和未授粉子房的表达量随着授粉时间的增加呈现波浪状趋势, 在自交授粉60 h达到最大值, 异交授粉78 h达到最大值, 未授粉36 h达到最大值(图7-A和B)。

## 3 讨论

自交不亲和是被子植物中防止近亲繁殖和保

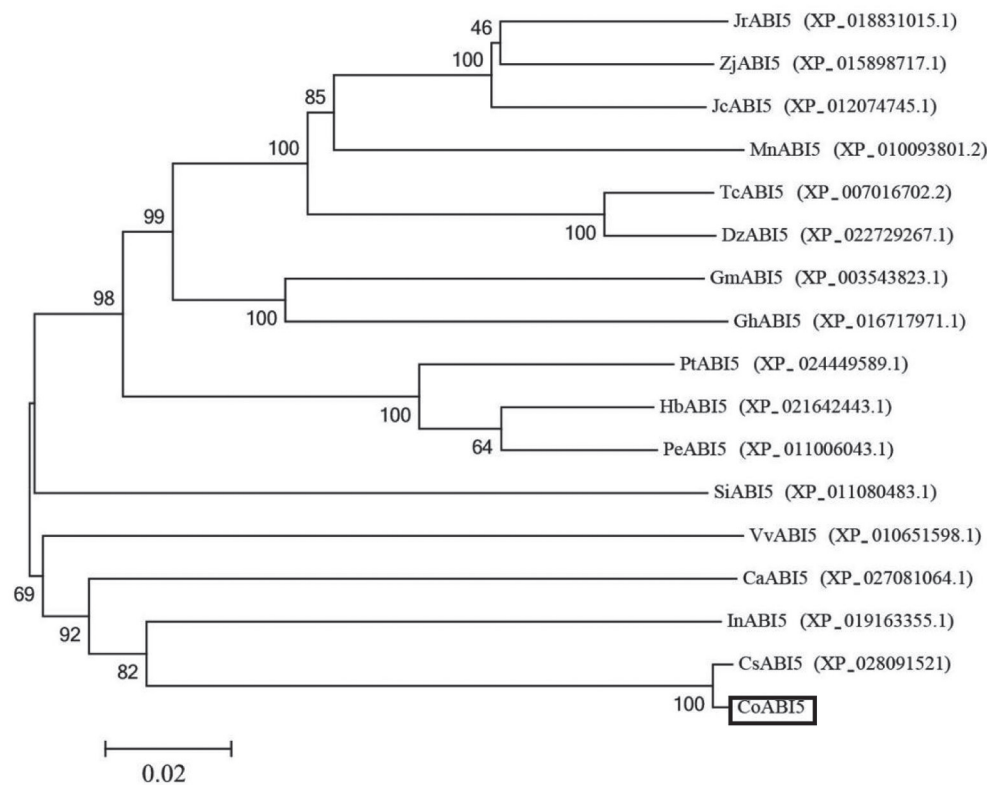


图3 CoABI5蛋白和其他植物ABI5蛋白的进化关系分析

Fig.3 Phylogenetic tree of the predict CoABI5 and other homologous proteins from different species

模型为泊松修正, Bootstrap的值为1 000。标尺: 进化距离。In: 矮牵牛; Hb: 巴西橡胶; Cs: 茶树; Co: 油茶; Gm: 大豆; Jr: 核桃; Pe: *Populus euphratica*, 胡杨; Ca: 咖啡; Tc: 可可; Dz: 榴莲; Jc: 麻风树; Pt: *Populus trichocarpa*, 毛白杨; Gh: 棉花; Vv: *Vitis vinifera*, 葡萄; Mn: *Morus notabilis*, 桑树; Zj: 枣; Si: *Sesamum indicum*, 芝麻。

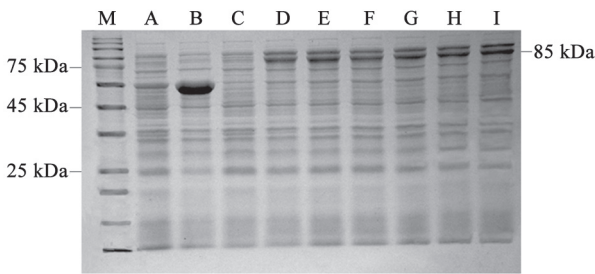


图4 CoABI5重组蛋白的SDS-PAGE电泳

Fig.4 SDS-PAGE electrophoresis of CoABI5 expression protein

M表示蛋白质Marker; A、B、C、D、E、F、G、H、I表示转空pCold-TF载体和转重组载体pCold-CoABI5-TF并经过IPTG诱导终浓度梯度为0、0.5、0.5、0.8、1.0、1.3、1.7、2.0 mmol·L<sup>-1</sup>。

持遗传变异的一种重要机制(曾斌等2017), 其过程涉及植物生长调节因子信号转导途径(齐国辉等

2007)。ABA作为一种重要的植物生长调节因子, 在成花诱导、花芽分化、开花调控、花发育中扮演着重要角色(Wang等2002)。ABA信号转导途径的分子网络调控十分复杂, 其中, ABI家族是参与调控ABA信号途径的重要转录因子, ABI1和ABI2在信号转导过程中起着负调控的作用(Hirayama等2007), ABI3和ABI4通过调控ABA的信号转导途径, 进而参与种子成熟和休眠过程(Finkelstein等2011; Reeves等2011)。目前ABI5在拟南芥中研究较多(李鲁华等2019)。在种子萌发及开花期间, *At-ABI5*是参与ABA信号的关键因子(郇蕾等2017)。在生长条件一致的环境下, 过表达*rABI5*基因的拟南芥植株呈现提早开花的表型(杨容容2018)。油茶作为我国四大木本油料树种之一, 由于品种间杂交结实率差异显著, 导致油茶品种间杂交育种

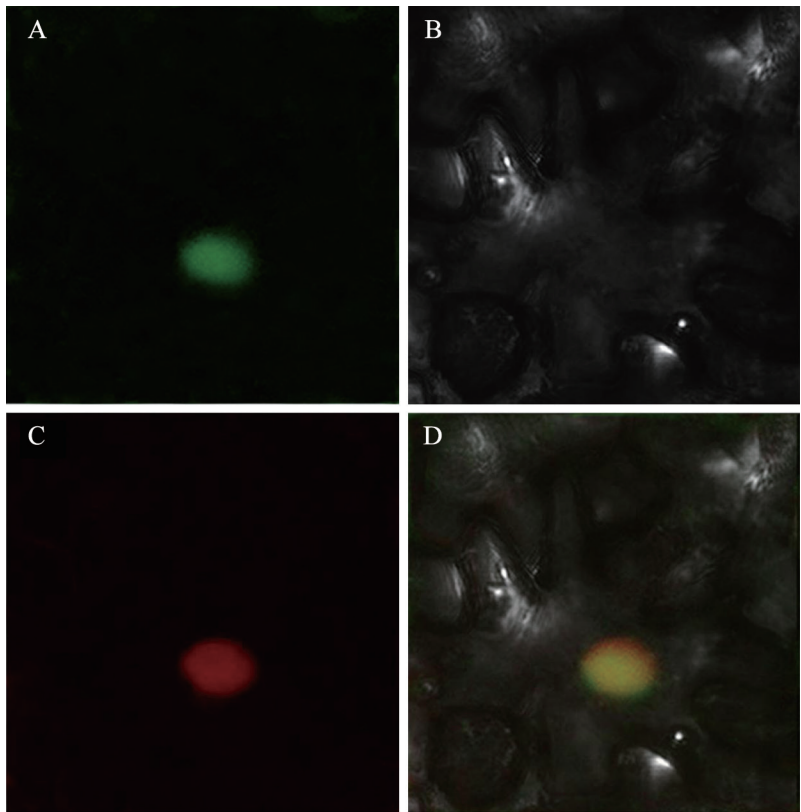


图5 CoABI5蛋白的亚细胞定位分析  
Fig.5 Subcellular localization analysis of CoABI5  
A: YFP; B: 白光; C: DAPI染料; D: 共定位图。

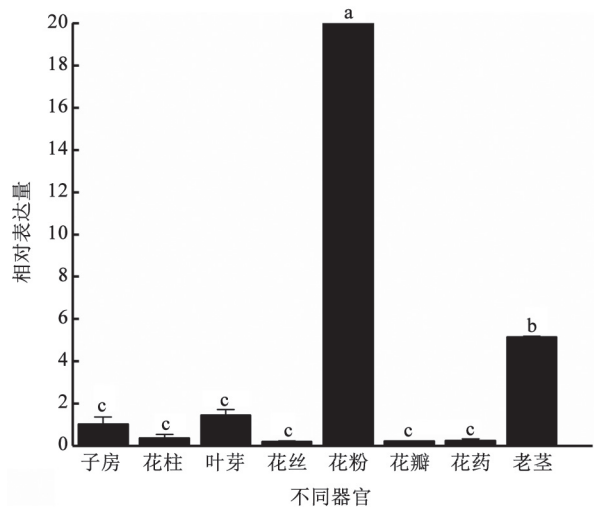


图6 *CoABI5*基因在油茶不同器官中的表达模式  
Fig.6 Expression pattern of *CoABI5* in different organs in *Camellia oleifera*  
各柱形上用不同小写字母标识表示数据间差异显著( $P<0.05$ ), 图7同。

遗传率低。现在已经证明, 油茶是后期自交不亲和树种, 但其分子机理尚不清楚。围绕*CoABI5*基因在油茶自交不亲和中的分子机制展开研究, 是提高油茶产量和品质的重要途径。

本研究克隆了*CoABI5*基因, 该基因编码蛋白含有(C1~C4) 4个保守结构域和一个bZIP结构域, 与ABI5转录因子的结构特点一致(Bensmihen等2002)。同源多序列比对发现*CoABI5*与其他物种的ABI5具有较高的同源性, 其中与茶树的相似性最高。根据系统进化树分析发现, *CoABI5*与CsABI5的亲缘关系最近, 这可能与油茶和茶树都是山茶科的木本油料树种有关。经SDS-PAGE电泳分析, 重组载体pCold-*CoABI5*-TF在37℃诱导4 h后, 在85 kDa左右处出现一条蛋白条带, 与预期大小一致, 表明*CoABI5*蛋白在大肠杆菌中诱导成功。本研究结果为检测带有His标签的*CoABI5*蛋白与带

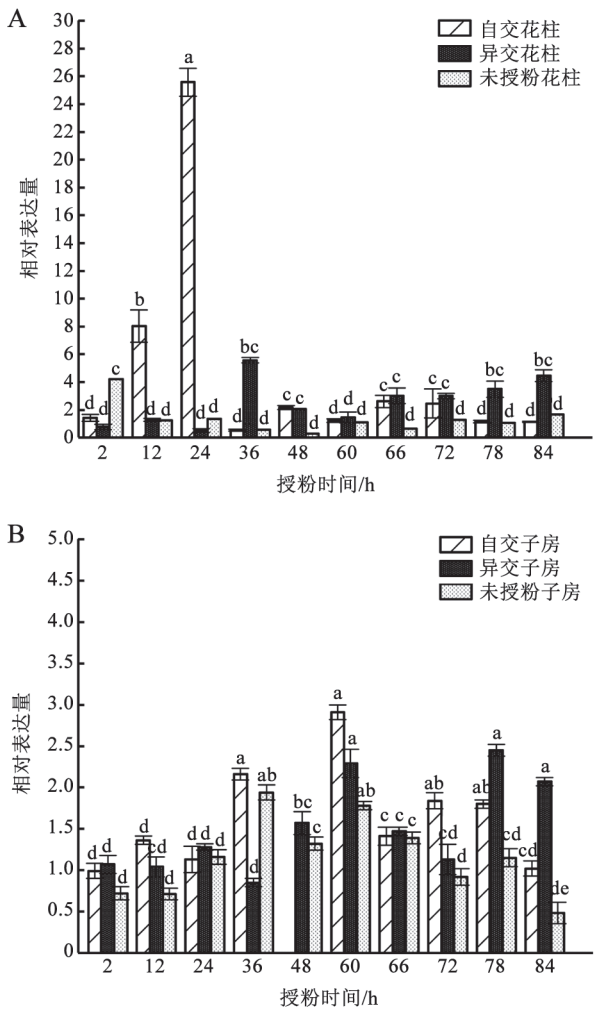


图7 不同处理下*CoABI5*基因在不同时间段的表达模式  
Fig.7 Expression patterns of *CoABI5* in different time periods under different treatments

有GST标签的蛋白是否有互作关系奠定基础,进一步揭示*CoABI5*的生物学功能。在本研究中,对*CoABI5*基因进行了亚细胞定位分析,确定*CoABI5*基因在烟草中瞬时表达,并定位于细胞核。水稻*ABI5*也定位于细胞核中(Zou等2008)。bZIP转录因子的作用通常是调控基因的转录水平,因此定位于细胞核中。实时荧光定量结果显示,*CoABI5*基因在不同组织和自交、异交和未授粉处理下的花柱和子房均有表达,但存在差异。其中,*CoABI5*基因在花粉中的表达量最高,根据前人的研究发现,*OsABI5*基因在成熟的花粉中高表达会降低育性(Zou等2008),说明*ABI5*可能参与花粉发育的过

程。*CoABI5*基因在自交24 h花柱中的表达量明显大于异交,猜测自交花粉管进入了花柱中部,聚集在一起向下生长,但36~84 h自交花粉管生长缓慢甚至停滞。*CoABI5*基因在异交48、78~84 h子房中的表达量大于自交,猜测在后期授粉中仅有少量自交花粉管进入到子房中,并且在子房中停止生长,最终导致自交不亲和现象(高超等2015;廖婷等2012)。

为了从不同角度阐明油茶后期自交不亲和性的分子机理,本研究通过基因克隆、进化树分析、qPCR时空表达、原核表达和亚细胞定位分析,初步判断*CoABI5*基因在油茶自交不亲和过程中发挥着重要作用。因此,为了对*CoABI5*基因进行全面而深入的研究,为油茶遗传育性分子机制提供科学依据,下一步将通过超表达或干扰等方法验证*CoABI5*的功能特点。

参考文献(References)

Baker RP, Hasenstein KH, Zavada MS (1997). Hormonal changes after compatible and incompatible pollination in *Theobroma cacao* L. J Am Soc Hort Sci, 32 (7): 1231–1234

Bensmihen S, Rippa S, Lambert G, et al (2002). The homologous ABI5 and EEL transcription factors function antagonistically to fine-tune gene expression during late embryogenesis. Plant Cell, 14: 1391–1403

Finkelstein RR, Lynch TJ (2000). The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. Plant Cell, 12: 599–609

Finkelstein R, Lynch T, Reeves W, et al (2011). Accumulation of the transcription factor ABA-insensitive (ABI) 4 is tightly regulated post-transcriptionally. J Exp Bot, 62 (11): 3971–3979

Gao C, Yuan DY, Yang Y, et al (2015). Anatomical characteristics of self-incompatibility in *Camellia oleifera*. Sci Silv Sin, 51 (2): 60–68 (in Chinese with English abstract) [高超, 袁德义, 杨亚等(2015). 油茶自交不亲和性的解剖特征. 林业科学, 51 (2): 60–68]

Hoth S, Niedermeier M, Feuerstein A, et al (2010). An ABA-responsive element in the *AtSUC1* promoter is involved in the regulation of *AtSUC1* expression. Planta, 232: 911–923

Hirayama T, Shinozaki K (2007). Perception and transduction of abscisic acid signals: Keys to the function of the versatile plant hormone ABA. Trends Plant Sci, 12 (8): 343–351

- Huan L, Wang XX, Chen XM, et al (2017). Constructing yeast one-hybrid library and screening the potential regulator of *PpABI5* in peach (*Prunus persica*). *Plant Physiol J*, 53 (7): 1259–1266 (in Chinese with English abstract) [邹蕾, 王旭旭, 陈修森等(2017). 桃ABA信号关键基因*PpABI5*酵母单杂交文库构建及其上游转录因子的筛选. *植物生理学报*, 53 (7): 1259–1266]
- Ibarra SE, Tognacca RS, Dave A, et al (2016). Molecular mechanisms underlying the entrance in secondary dormancy of *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell Environ*, 39: 213–221
- Kovaleva L, Zakharova E (2003). Hormonal status of the pollen-pistil system at the progamic phase of fertilization after compatible and incompatible pollination in *Petunia hybrida* L. *Sex Plant Reprod*, 16: 191–196
- Liu ML (2015). Study on cloning and functional expression of *KAR* gene in *Vernicia fordii* (dissertation). Changsha: Central South University of Forestry & Technology (in Chinese with English abstract) [刘美兰(2015). 油桐*KAR*基因的克隆与功能研究(学位论文). 长沙: 中南林业科技大学]
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods*, 25: 402–408
- Liao T, Yuan DY, Peng SF, et al (2012). A fluorescence microscope observation on self and cross-pollination of pollen tubes in *Camellia oleifera*. *J Cent S Forest Univ*, 32 (7): 34–37 (in Chinese with English abstract) [廖婷, 袁德义, 彭邵峰等(2012). 油茶自交和异交过程花粉管生长的荧光显微观察. *中南林业科技大学学报*, 32 (7): 34–37]
- Li LH, Wang ZN, Wang WX, et al (2019). Research advances of plant *ABI5* transcription factors. *J Shandong Agr Univ*, 50 (4): 537–541 (in Chinese with English abstract) [李鲁华, 王忠妮, 王文新等(2019). 植物*ABI5*转录因子的研究进展. *山东农业大学学报*, 50 (4): 537–541]
- Liao CJ, Lai ZB, Lee SH, et al (2016). *Arabidopsis* HOOKLESS1 regulates responses to pathogens and abscisic acid through interaction with MED18 and acetylation of *WRKY33* and *ABI5* chromatin. *Plant Cell*, 28: 1662–1681
- Qi GH, Xu JZ, Zhang YX (2007). Relationship between endogenous hormones in style and self-incompatibility of Yali pear (*Pyrus bretschneideri*). *J Hebei Agr Univ*, 30 (1): 31–34 (in Chinese with English abstract) [齐国辉, 徐继忠, 张玉星(2007). 鸭梨自交不亲和性与花柱内源激素关系的研究. *河北农业大学学报*, 30 (1): 31–34]
- Ren JJ (2018). *U2AF65b* functions in ABA mediated flowering-time regulation via pre-mRNA splicing of *ABI5* and *FLC* in *Arabidopsis* (dissertation). Taian, Shandong: Shandong Agricultural University (in Chinese with English abstract) [任静静(2018). *AtU2AF65b*通过*ABI5*和*FLC* pre-mRNA的剪接参与拟南芥ABA介导的开花时间调控(学位论文). 山东泰安: 山东农业大学]
- Reeves WM, Lynch TJ, Mobin R, et al (2011). Direct targets of the transcription factors ABA-insensitive(*ABI*) 4 and *ABI5* reveal synergistic action by *ABI4* and several *bZIP* ABA response factors. *Plant Mol Biol*, 75: 347–363
- Sun XY (2016). Isolation and characterization of *ABI5* in Chinese wheat with different depth of dormancy (dissertation). Huhhot: Inner Mongolia Agricultural University (in Chinese with English abstract) [孙晓燕(2016). *ABI5*基因在不同休眠特性小麦中的鉴定和表达特异性研究(学位论文). 呼和浩特: 内蒙古农业大学]
- Schweighofer A, Hirt H, Meskiene I (2004). Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci*, 9 (5): 236–243
- Tan XF, Yuan DY, Yuan J, et al (2011). An elite variety: *Camellia oleifera* ‘Huashuo’. *Sci Silv Sin*, 47 (12): 184–209 (in Chinese with English abstract) [谭晓风, 袁德义, 袁军等(2011). 大果油茶良种‘华硕’. *林业科学*, 47 (12): 184–209]
- Tan XF, Yuan DY, Zou F, et al (2012). An elite variety of oiltea: *Camellia oleifera* ‘Huaxin’. *Sci Silv Sin*, 48 (3): 170–171 (in Chinese with English abstract) [谭晓风, 袁德义, 邹峰等(2012). 油茶良种‘华鑫’. *林业科学*, 48 (3): 170–171]
- Wheeler MJ, de Graaf BHJ, Hadjiosif N, et al (2009). Identification of the pollen self-incompatibility determinant in *Papaver rhoeas*. *Nature*, 459: 992–995
- Wang WY, Chen WS, Chen WH, et al (2002). Influence of abscisic acid on flowering in *Phalaenopsis hybrida*. *Plant Physiol Bioch*, 40: 97–100
- Wu FY, Li Z, Liu FD, et al (2018). Comparison of photosynthetic characteristics of *Camellia oleifera* cultivars. *Non-wood For Res*, 36 (2): 7–13 (in Chinese with English abstract) [吴方圆, 李泽, 刘繁灯等(2018). 油茶主栽品种光合特性的比较. *经济林研究*, 36 (2): 7–13]
- Yan F (2017). The functional studies of *Maize ABA-insensitive (ABI) 5* gene in abiotic stresses (dissertation). Chongqing: Chongqing University (in Chinese with English abstract) [燕芳(2017). 玉米*ABA-insensitive (ABI) 5*基因在非生物逆境胁迫下的功能研究(学位论文). 重庆: 重庆大学]
- Yang RR (2018). Study on the regulation of plant growth and development of *Arabidopsis* transcription factor *ABI5* (dissertation). Lanzhou: Lanzhou University of technology (in Chinese with English abstract) [杨容容(2018). 拟南芥转录因子*ABI5*调控植物生长发育模式的研究(学位论文). 兰州: 兰州理工大学]
- Yang XR, Bai Y, Shang JX, et al (2016). The antagonistic regulation of abscisic acid-inhibited root growth by brassinosteroids is partially mediated via direct suppression of *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 5* expression by

- BRASSINAZOLE RESISTANT 1. *Plant Cell Environ*, 39: 1994–2003
- Yu SS, Zhou JQ, Lu MQ, et al (2019). Cloning and expression analysis of *Camellia oleifera* transporter gene *ABCB26*. *Plant Physiol J*, 55 (11): 1664–1672 (in Chinese with English abstract) [余姝姝, 周俊琴, 卢梦琪等(2019). 油茶转运蛋白基因*ABCB26*的克隆及表达分析. 植物生理学报, 55 (11): 1664–1672]
- Yuan DY, Zou F, Tan XF, et al (2011). Flower bud differentiation and development of male and female gametophytes of *Camellia oleifera*. *J Cent S Forest Univ*, 31 (3): 65–70 (in Chinese with English abstract) [袁德义, 邹锋, 谭晓风等(2011). 油茶花芽分化及雌雄配子体发育的研究. 中南林业科技大学学报, 31 (3): 65–70]
- Zhang SI, Gao FY, Chen DX, et al (2003). The effects of plant growth regulating substances on pollen germination and tube growth in Fengshui pear (*Pyrus serotina*). *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 23 (4): 586–591 (in Chinese with English abstract) [张绍铃, 高付永, 陈迪新等(2003). 植物生长调节物质对丰水梨花粉萌发和花粉管生长的影响. 西北植物学报, 23 (4): 586–591]
- Zeng B, Guan P, Li J, et al (2017). Cloning and sequence analysis of 2 full-length *SFB* genes in *Prunus tenella*. *Non-wood Forest Res*, 35 (2): 1–9 (in Chinese with English abstract) [曾斌, 关鹏, 李疆等(2017). 2个野扁桃自交不亲和*SFB*基因全长的克隆与序列分析. 经济林研究, 35 (2): 1–9]
- Zou MJ, Guan YC, Ren HB, et al (2008). A bZIP transcription factor, OsABI5, is involved in rice fertility and stress tolerance. *Plant Mol Biol*, 66: 675–683
- Zhao G, Song ZB, Liu ML, et al (2017). Cloning and expression analysis of a phospholipid: diacylglycerol acyltransferase (PDAT) gene in *Camellia oleifera*. *Plant Physiol J*, 53 (9): 1619–1628 (in Chinese with English abstract) [赵广, 宋志波, 刘美兰等(2017). 油茶*CoPDAT*基因的克隆与表达分析. 植物生理学报, 53 (9): 1619–1628]

## Cloning and expression analysis of *ABI5* from *Camellia oleifera*

YANG Jin, ZHOU Junqin, LU Mengqi, YU Shushu, LIU Yiyao, TAN Xiaofeng\*

Key Laboratory of Cultivation and Protection for Non-wood Forest Trees, Ministry of Education; Key Lab of Non-wood Forest Products of State Forestry Administration; Cooperative Innovation Center of Cultivation and Utilization for Non-wood Forest Trees of Hunan Province; Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China

**Abstract:** In this study, the *Camellia oleifera* cultivar ‘Huashuo’ was used as the material to clone the abscisic acid-insensitive 5 of *Camellia oleifera* by RT-PCR method, which was named *CoABI5*. The *CoABI5* gene was analyzed by bioinformatics using different online sites, and the expression, expression site and expression pattern of *CoABI5* gene were analyzed by using prokaryotic expression, subcellular localization and real-time quantitative RT-PCR. The results showed that the sequence CDS length of *CoABI5* was 795 bp and encoded 344–363 amino acids, *CoABI5* had the highest similarity (97.3%) with the *ABI5* of *Camellia sinensis*. Prokaryotic expression showed that fusion protein pCold-*CoABI5*-TF was induced for 4 h at 37°C, it had a protein band at 85 kDa, which was consistent with the molecular weight of the theoretical fusion protein. Subcellular localization showed that *CoABI5* gene was located in the nucleus. Real-time quantitative RT-PCR results showed that *CoABI5* gene was highly expressed in pollens, and the expression of *CoABI5* gene in style of selfs 24 h was higher than that of ‘Huashuo’ and ‘Huaxin’ outcrosses, the expression of *CoABI5* gene in ovary of outcrosses 48 h was higher than that of selfs. This study provides a research basis for the further exploring the role of *CoABI5* gene in late self-incompatibility of *Camellia oleifera* and it is great significance for the analysis of the molecular mechanism of self-incompatibility of *Camellia oleifera*.

**Key words:** *Camellia oleifera*; self-incompatibility; *ABI5* gene; prokaryotic expression; subcellular localization; expression pattern

Received 2020-02-12 Accepted 2020-05-30

This work was supported by Key Projects of National Natural Science Foundation of China (31730016).

\*Corresponding author (tanxiaofengcn@126.com).