园　艺　学　报　2014，41（12）：2465－2473　　　　http: // www. ahs. ac. cn
Acta Horticulturae Sinica　　　　E-mail: yuanyixuebao@126.com

茶树鸟氨酸转氨酶基因*Csδ-OAT*的克隆与表达分析

王伟东，疏再发，杜昱林，黎星辉，王玉花*
（南京农业大学茶叶科学研究所，南京 210095）

摘　要：根据已知鸟氨酸转氨酶（δ-OAT）的保守序列设计简并引物，并利用 RT-PCR 和 RACE 技术从‘迎霜’茶树中克隆获得鸟氨酸转氨酶基因，命名为 *Csδ-OAT*，其 GenBank 登录号为 KJ641844。该基因 cDNA 全长为 1 865 bp，编码 473 个氨基酸，理论等电点为 7.19，推测分子量为 52.3 kD。序列比对分析结果表明，Csδ-OAT 主要功能域保守性较高，存在典型的 PLP 结合位点；系统进化树分析显示，Csδ-OAT 的进化符合传统的生物学分类，与其他双子叶植物具有同一起源。qRT-PCR 分析结果表明，*Csδ-OAT* 基因的表达存在明显的组织特异性，在花中表达最高，其次是叶片，而在其他组织器官中表达较低。此外，*Csδ-OAT* 基因受高盐、低温、干旱、ABA 和氧化胁迫处理的诱导，表明其参与了茶树体内各种非生物胁迫响应的过程。

关键词：茶树；鸟氨酸转氨酶；*Csδ-OAT*；克隆；表达分析

中图分类号：S 571.1　　　**文献标志码**：A　　　**文章编号**：0513-353X（2014）12-2465-09

Cloning and Expression Analysis of Ornithine-δ-aminotransferase Gene *Csδ-OAT* in *Camellia sinensis*

WANG Wei-dong，SHU Zai-fa，DU Yu-lin，LI Xing-hui，and WANG Yu-hua*
（*Tea Research Institute*，*Nanjing Agricultural University*，*Nanjing* 210095，*China*）

Abstract：Degenerate primers were designed according to the known conserved regions of Ornithine-δ-aminotransferase gene（*δ-OAT*），and the complete cDNA sequence of *δ-OAT* was firstly cloned from *Camellia sinensis* using RT-PCR and RACE technologies. The cDNA was termed *Csδ-OAT*（GenBank accession KJ641844）and its full-length was 1 865 bp encoding a protein of 473 amino acids. The molecular weight of Csδ-OAT was 52.3 kD and theoretical isoelectric point was 7.19. The BLAST results showed that the functional domain of Csδ-OAT is highly conserved with a typical PLP binding site. Phylogenetic analysis of plant δ-OAT reveals that the evolution of Csδ-OAT corresponds with traditional biological classification. QRT-PCR analysis results showed that the expression of *Csδ-OAT* has obvious tissue specificity，and it was higher in flower，followed by leaves，but lower in other tissues. Moreover，we found that the expression of *Csδ-OAT* is induced by different abiotic stresses，including low-temperature，high salinity，ABA，drought and oxidative stresses，implying that *Csδ-OAT* is involved in

收稿日期：2014－07－11；**修回日期**：2014－09－25
基金项目：国家自然科学基金项目（31370014，31000315）；国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目（CARS-23）
* 通信作者 Author for correspondence（E-mail：wangyuhua@njau.edu.cn）

responding to abiotic stress in plants.

Key words：tea plant；ornithine-δ-aminotransferase；*Csδ-OAT*；cloning；expression analysis

茶树［*Camellia sinensis*（L.）O. Kuntze］容易遭受干旱、低温和土壤污染等引起的非生物胁迫，导致茶叶产量和品质降低，最终影响茶叶生产的经济效益（王新超和杨亚军，2003）。因此，发掘茶树的抗性基因，培育抗性品种具有重大意义。

脯氨酸参与植物对多种逆境胁迫的响应，在提高植物抗逆性中发挥重要作用（焦蓉 等，2011b；谢虹 等，2011）。高等植物中脯氨酸的合成代谢有谷氨酸（Glu）和鸟氨酸（Orn）两条途径，Δ^1－吡咯啉－5－羧酸合成酶（P5CS）是谷氨酸合成途径的关键酶，而鸟氨酸转氨酶（δ-OAT）是鸟氨酸合成途径的关键酶（全先庆 等，2007；赵瑞雪 等，2008）。许多研究表明，δ-OAT 对逆境胁迫下脯氨酸的积累起着重要作用，Roosens 等（2002）将拟南芥的 *δ-OAT* 过表达至烟草中，显著增加了烟草脯氨酸的含量，其抗旱性得到显著提高；Wu 等（2003）将拟南芥的 *δ-OAT* 遗传转化至水稻中，显著提高了水稻的耐盐能力；Roosens 等（1998）的研究表明，*δ-OAT* 的表达受到盐胁迫的诱导。目前，*δ-OAT* 已从拟南芥（Roosens et al.，1998）、甘蔗（张积森 等，2009）、豌豆（Stránská et al.，2010）和烟草（焦蓉 等，2011a）等植物中克隆得到，但有关 *δ-OAT* 功能的研究相对滞后，其参与植物逆境响应的作用机制尚不清楚。

本研究中从茶树中克隆得到了 *Csδ-OAT* 基因的 cDNA 全长序列，利用生物信息学手段初步分析了该基因的结构和功能，并通过实时荧光定量 PCR 技术分析了该基因在各种非生物胁迫中的表达模式，以探究 *Csδ-OAT* 与茶树抗逆性的关系，为茶树抗逆基因工程提供候选基因资源，为茶树分子遗传育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料与处理

基因克隆以体外培养的‘迎霜’茶树花粉管为试验材料，花粉的收集和培养方法参考陈暄等（2011）所述。胁迫处理试验于 2013 年 8 月在南京农业大学茶叶研究所进行，选取长势一致的 4 年生‘迎霜’茶树苗为材料进行水培培养，培养液的配制参考 Wan 等（2012）所述。将水培茶苗于光照培养箱中（昼夜温度 25 ℃/22 ℃，光周期 12 h/12 h，光照强度 240 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$，相对湿度 75%～80%）预培养两周后进行不同的胁迫处理，包括低温（4 ℃）、NaCl（600 $mmol \cdot L^{-1}$）、ABA（50 $\mu mol \cdot L^{-1}$）、PEG 6000（20%）和 H_2O_2（100 $mmol \cdot L^{-1}$）。分别于 0、1、2、4、8、12 和 24 h 时取一芽两叶各 0.1 g，并将所取材料置于液氮中速冻，－70 ℃冰箱保存备用。

分别取‘迎霜’茶苗的根、茎、叶、芽、花和果各 0.1 g，并将所取材料置于液氮中速冻，－70 ℃冰箱保存，用于基因的组织特异性表达分析。

1.2 总RNA提取和cDNA合成

用 RNAiso Plus（TaKaRa，日本）提取培养后的茶树花粉管和其他组织材料的总 RNA，并用 DNase 去除基因组 DNA 污染。用 ONE Drop™ OD-1000 + Spectrophotometer（ONE Drop，USA）检测 RNA 浓度和质量，琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性和稳定性。使用 PrimeScript™ 1st Strand cDNA SyCshesis Kit（TaKaRa，大连）进行 cDNA 第 1 链的合成。参照 SMART RACE cDNA Synthesis Kit（Clontech，美国）的操作步骤合成 RACE 扩增所用的 cDNA。

1.3　茶树*Csδ-OAT*的克隆

利用 DNAMAN 软件对 GenBank 中已公布的葡萄、蓖麻、平邑甜茶、毛果杨、烟草、白菜、甘蓝型油菜、拟南芥和杨树 δ-OAT 酶的氨基酸序列进行同源分析，然后根据 *δ-OAT* 基因的保守区段，利用 Primer premier 5.0 软件设计一对简并引物 δ-OAT F 和 δ-OAT R（表 1），扩增一段长度为 680 bp 左右的中间片段。根据已获得茶树 *Csδ-OAT* 基因的中间片段序列设计 3′、5′-RACE 引物 3′GSP1、3′GSP2，5′GSP1 和 5′GSP2（表 1），并结合通用引物分别扩增出该基因的 3′和 5′端序列。将所得的两端序列与中间片段序列拼接得到基因全长，设计一对全长引物 Csδ-OAT F，Csδ-OAT R（表 1）高保真扩增出基因的全长。所用引物均由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

表 1　引物序列

Table 1　Sequences of primers in this study

引物名称 Primer name	序列（5′－3′） Sequence
δ-OAT F	GTYAATCAGGGACAYTGYCAYCCWA
δ-OAT R	AGCATNACDTYTTTRTCDGCRAG
3′GSP1	ATGAATACTGGTGCCGAAGG
3′GSP2	GTCTCGTGTTGTGGCTGCTT
5′GSP1	CAACATCTGGGCGAACT
5′GSP2	ATGGAAGCAGCCACAAC
Csδ-OAT F	AATCTACAACTTCATCGCTCAGCGCCCT
Csδ-OAT R	GGTACCCAACAAAATTTTATTCACAAT
qCsδ-OAT F	GCGGTTAATCAGGGACAT
qCsδ-OAT R	ACACCTTCGGCACCAGTA
qβ-actin F	GCCATCTTTGATTGGAATGG
qβ-actin R	GGTGCCACAACCTTGATCTT

扩增产物经 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测后，将目的条带按照 Gel Extraction Kit（OMEGA）使用说明进行回收，连接到 pMDA18-T Vector（TaKaRa），由南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。

1.4　*Csδ-OAT*生物信息学分析

利用 NCBI 进行核苷酸和氨基酸序列比对和保守结构域分析；用 ProtParam 预测蛋白质分子量和理论等电点；用 SMART（http：//smart. embl-heidelberg. de/）进行保守域分析；用 DNAMAN 6.0 进行多序列氨基酸同源性比较；用 MEGA 6.0 软件中的邻近相连法（NJ，Neighbor Joining）构建系统进化树；用 WoLF PSORT（http：//wolfpsort. org/）进行亚细胞定位预测；用 TMPRED（http：//www. ch. embnet. org/software/TMPRED_form. html）预测蛋白跨膜结构域；用 NetPhos 2.0 Serve（http：//www. cbs. dtu. dk/services/NetPhos/）预测蛋白质磷酸化位点；用 SWISS-MODEL（http：//swissmodel. expasy. org/workspace/）预测蛋白质三级结构。

1.5　*Csδ-OAT*荧光定量PCR分析

以茶树 *β-actin*（孙美莲 等，2010）作为内参基因，参照 SYBR® Premix Ex *Taq*™ II（TaKaRa，大连）的操作说明书对 *Csδ-OAT* 基因的表达量进行荧光定量 PCR 分析，PCR 体系为：SYBR® Premix Ex *Taq* 10 μL，上、下游引物各 1 μL，cDNA 5 μL，RNase Free ddH_2O 加至 20 μL。在 Eppendorf 荧光定量 PCR 仪上进行反应。反应程序为：95 ℃预变性 60 s；95 ℃ 15 s，60 ℃ 15 s，72 ℃ 45 s，40 个循环。反应结束后分析荧光值变化曲线和熔解曲线，采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析结果（Livak & Schmittgen，2001），每个样品 3 次重复。使用 Primer Premier 5.0 设计 *Csδ-OAT* 荧光定量所需的引物 qCsδ-OAT F、qCsδ-OAT R 和 qβ-actin F、qβ-actin R（表 1）。

用 Excel 2010 和 SPSS 19 软件进行数据整理和统计学分析，用邓肯氏新复极差法进行多重比较。

2　结果与分析

2.1　*Csδ-OAT*基因克隆与序列分析

用简并引物进行 PCR 扩增，获得 1 条 680 bp 的中间片段（图 1，A1），该片段经 NCBI 比对与其他已知植物的 *δ-OAT* 序列有较高同源性，由此判断为茶树 *δ-OAT* 基因 cDNA 的部分序列。根据获

得的中间片段序列设计 RACE 特异性引物进行巢式 PCR 扩增，5′-RACE 扩增获得 1 条长度为 761 bp 的特异性片段（图 1，B3、B4），3′-RACE 扩增获得 1 条长度为 1 201 bp 的特异性片段（图 1，B1、B2）。序列拼接后设计全长引物，经高保真 PCR 扩增获得长度为 1 865 bp 的全长 cDNA 序列（图 1，C1），包含 1 422 bp 的完整 ORF，编码 473 个氨基酸，理论等电点为 7.19，推测分子量为 52.3 kD。经 Blastp 比对结果显示，所得基因编码的氨基酸与其他植物 δ-OAT 的氨基酸序列具有很高的同源性，与猕猴桃 Acδ-OAT（*Actinidia chinensis*，ABR45720.1）同源性为 89%，与可可 Tcδ-OAT（*Theobroma cacao*，XP_007025036.1）为 85%，与湖北海棠 Mhδ-OAT（*Malus hupehensis*，AEO51063.1）为 82%，与烟草 Ntδ-OAT（*Nicotiana tabacum*，ADM47437.1）为 82%，与菊芋 Htδ-OAT（*Heliacshus tuberosus*，AHJ08571.1）为 75%。表明新克隆的 cDNA 序列为茶树鸟氨酸转氨酶基因，将该基因命名为 *Csδ-OAT*（*Camellia sinensis* ornithine δ-aminotransferase），并将其登录到 GenBank，登录号为 KJ641844。

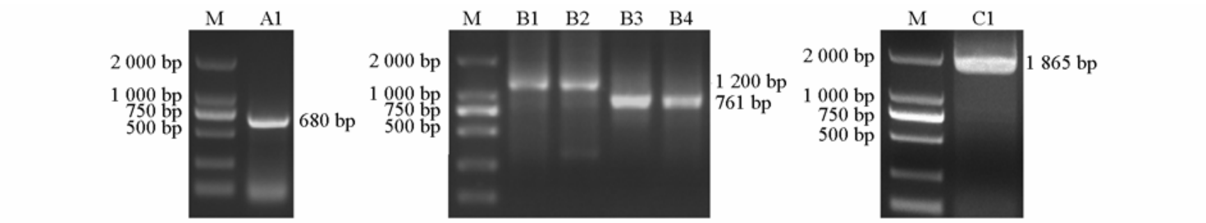

图 1 *Csδ-OAT* 的 PCR 扩增产物电泳结果

M：2 000 bp DNA marker；A1：中间片段扩增结果；B1、B2：3′-RACE 扩增结果；B3、B4：5′-RACE 扩增结果；C1：全长扩增结果。

Fig. 1 Electrophoresis results of PCR amplification of *Csδ-OAT*

M：2 000 bp DNA marker；A1：Product of segment；B1，B2：Product of 3′-RACE；
B3，B4：Product of 5′-RACE；C1：Product of full cDNA.

2.2 *Csδ-OAT*编码蛋白的生物信息学分析

2.2.1 Csδ-OAT 的结构域预测

利用 NCBI 对 Csδ-OAT 的结构域和结合位点分析（图 2）表明，Csδ-OAT 属于乙酰鸟氨酸氨基转移酶家族，该家族是依赖磷酸吡哆醛（PLP）的天冬氨酸氨基转移酶超家族。催化转氨作用的关键部位 PLP 结合位点由 8 个氨基酸残基（$G^{138}A^{139}F^{173}H^{174}E^{228}D^{261}Q^{264}K^{290}$）构成，其中 290 位的赖氨酸（K）是催化中心，PLP 的结合引起蛋白构象变化而激活转氨酶活性。抑制因子结合位点由 11 个氨基酸残基（$T^{137}G^{138}A^{139}F^{173}H^{174}R^{176}E^{228}D^{261}I^{263}Q^{264}K^{290}$）构成。

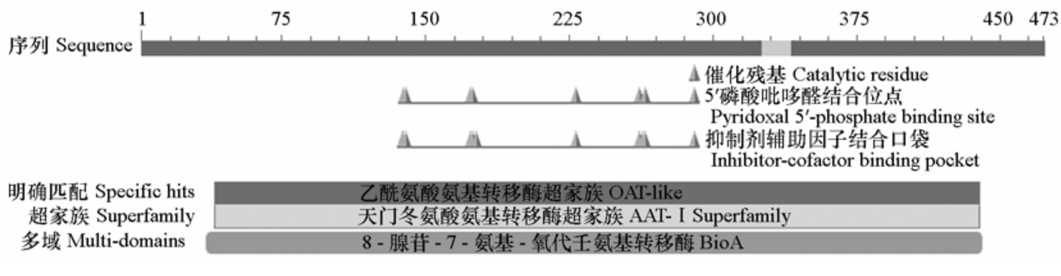

图 2 Csδ-OAT 编码氨基酸的保守区域分析结构图

Fig. 2 Conserved domains analysis of Csδ-OAT deduced amino acid

2.2.2 Csδ-OAT 的跨膜结构预测

通过 TMPRED 对 *Csδ-OAT* 编码的氨基酸序列进行跨膜区预测显示，在 164 ~ 185 和 285 ~ 305 形成两个可能的跨膜螺旋，加权总分达 1 119 分，远远大于 500（模型认为大于 500 分即存在有意义的跨膜螺旋），表明跨膜预测真实有效，因此推测该基因编码的酶为跨膜蛋白。

2.2.3　Csδ-OAT 的磷酸化位点预测

用 NetPhos 2.0 Serve 预测 Csδ-OAT 蛋白的磷酸化位点（图 3），结果表明含有丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸共 21 个磷酸化位点，其中以丝氨酸位点最多，有 11 个，苏氨酸和酪氨酸位点分别有 4 个和 6 个。由此推测 Csδ-OAT 蛋白的活性可能受到磷酸化作用的调控。

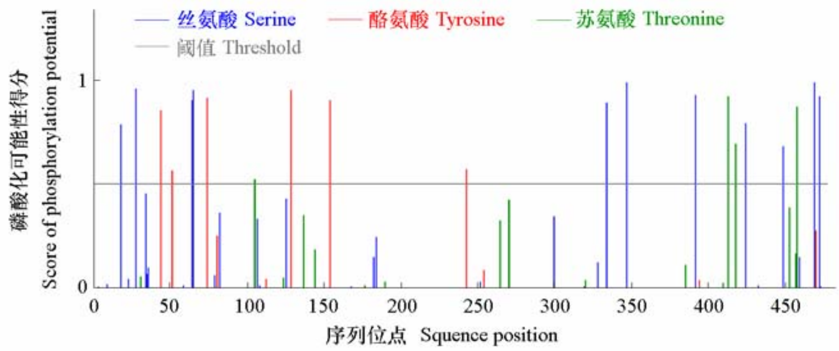

图 3　Csδ-OAT 蛋白磷酸化位点预测

Fig. 3　Phosphorylation site prediction of Csδ-OAT protein

2.2.4　Csδ-OAT 的三级结构预测

用 SWISS-MODEL 对 Csδ-OAT 蛋白的三级结构进行预测，得到 Csδ-OAT 蛋白的三维结构。结果与 Stránská 等（2008）获得的豌豆 δ-OAT 蛋白三级结构模型图相似，均含有 δ-OAT 典型的 PLP 辅助因子结构，进一步证实获得的 *Csδ-OAT* 基因编码蛋白属于依赖 PLP 的鸟氨酸氨基转移酶。

2.3　系统进化树分析

选择 17 个与茶树 *Csδ-OAT* 编码蛋白同源性较高的 δ-OAT 蛋白序列，利用 MEGA 6.0 软件构建 NJ 系统进化树。如图 4 所示，以 0.02 为结点可以将植物 δ-OAT 分为两个类群：第 I 类为双子叶植

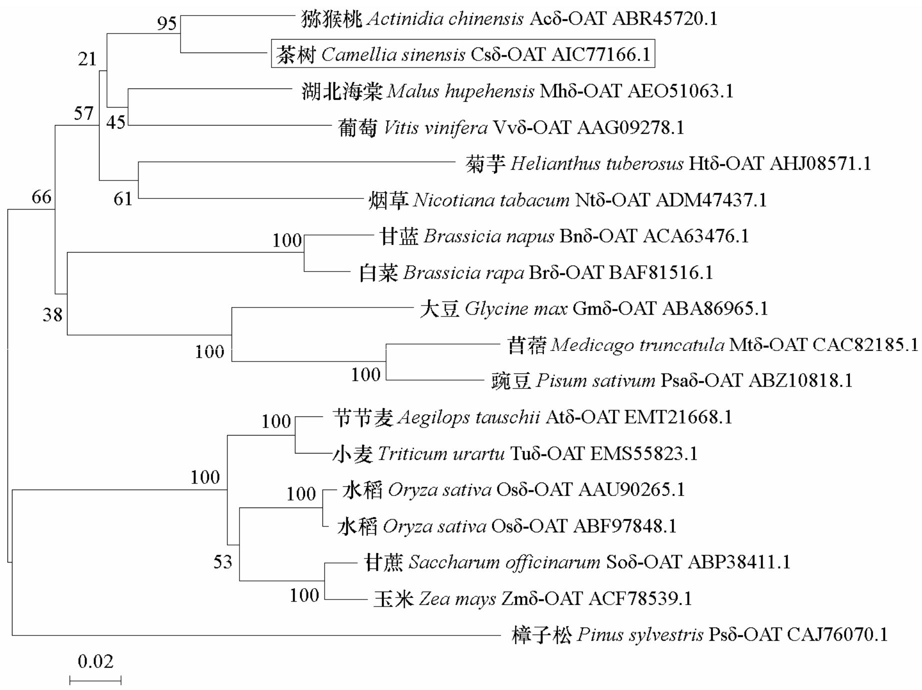

图 4　Csδ-OAT 与其他植物 δ-OAT 蛋白的系统进化关系

Fig. 4　Phylogenetic relatedness among Csδ-OAT and other plants δ-OAT proteins

物的 δ-OAT 进化关系，其中茶树 Csδ-OAT 与猕猴桃 Acδ-OAT 亲缘关系最近，可能为直系同源蛋白，其次为湖北海棠和葡萄，而与烟草和菊芋亲缘关系较远，表明茶树 Csδ-OAT 与双子叶植物中的木本植物亲缘关系较近，而与草本植物的亲缘关系较远；第Ⅱ类主要为单子叶植物和裸子植物的 δ-OAT 进化关系，其中单子叶植物聚为一簇，表明其由同一祖先进化而来。总之，由系统进化树分析可以看出 δ-OAT 的进化关系与植物形态学上分类的进化关系较一致，反映了 Csδ-OAT 蛋白的进化规律和物种的亲缘关系规律。

2.4 *Csδ-OAT*的荧光定量表达分析

2.4.1 *Csδ-OAT* 的胁迫处理表达分析

在 NaCl 胁迫处理期间，茶树叶片中 *Csδ-OAT* 基因的表达量从 1 h 开始逐渐增加，在 12 h 时达到最高，为对照的 2.64 倍，之后开始降低，呈现出先上升后降低的变化趋势（图 5），表明高盐胁迫可以显著诱导茶树叶片中 *Csδ-OAT* 基因的表达。

在 ABA 诱导处理期间，茶树叶片中 *Csδ-OAT* 基因的表达量在 1 ~ 8 h 表现出缓慢地增加，在 12 h 时迅速增加至对照的 3.1 倍，之后迅速降低到 1.5 倍水平（图 5），表明 ABA 可以显著诱导茶树叶片中 *Csδ-OAT* 基因的表达，并表现出爆发性增加的特点。

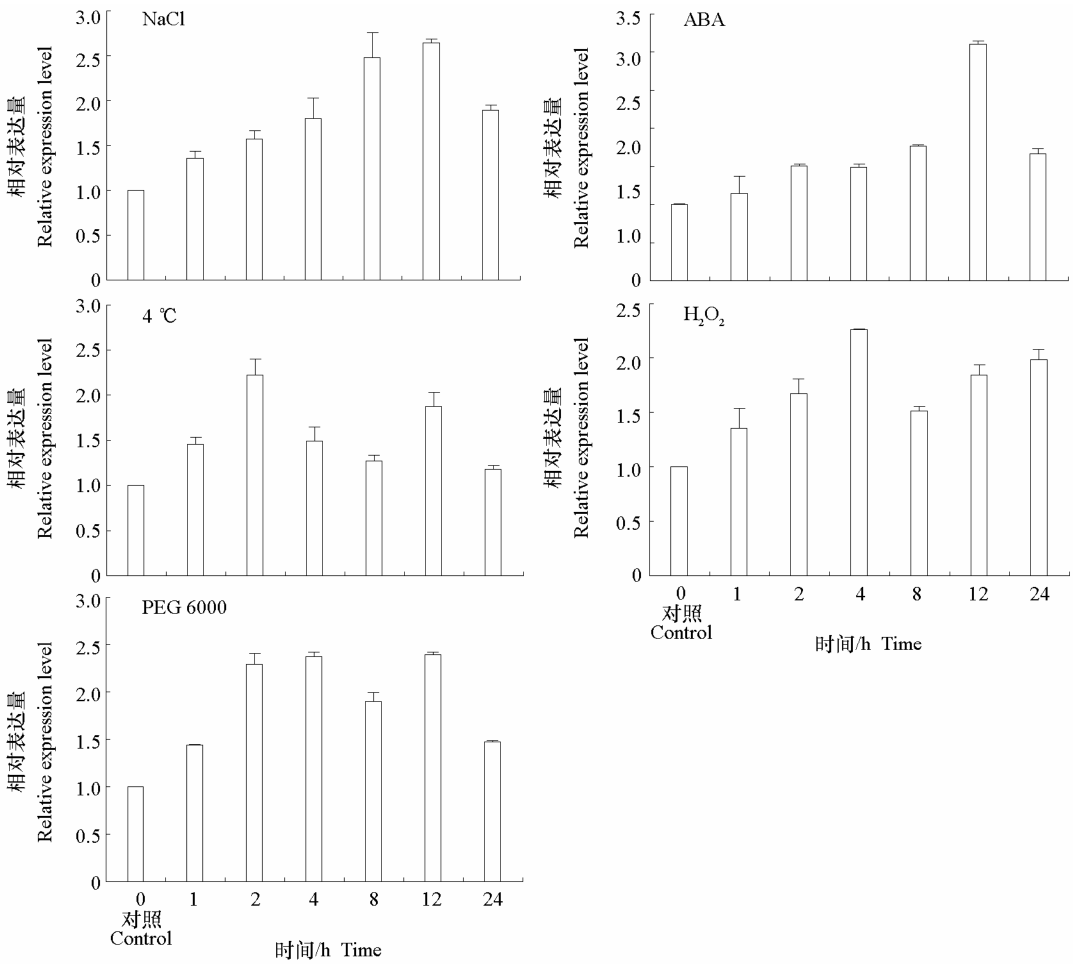

图 5 *Csδ-OAT* 基因在不同胁迫处理下的表达量

Fig. 5 Relative expression of *Csδ-OAT* under different stress treatments

在 4 ℃低温胁迫处理期间，茶树叶片中 *Csδ-OAT* 基因的表达量出现两次高峰，其中 2 h 的表达量为对照的 2.2 倍，12 h 的表达量为对照的 1.9 倍，呈现出先上升后降低再上升再降低的变化趋势（图 5）。

在干旱胁迫处理期间，茶树叶片中 *Csδ-OAT* 基因的表达量从 1 h 开始迅速增加，并在 2 ~ 12 h 维持在较高水平，其表达量约为对照的 2.2 倍左右，之后其表达量开始降低，总体呈现出先上升后降低的变化趋势（图 5）。

在 H_2O_2 胁迫处理期间，茶树叶片中 *Csδ-OAT* 基因的表达量出现两次高峰，分别为 4 h 和 24 h，其表达量分别为对照的 2.3 倍和 2.0 倍，整体呈现出先升高后降低再升高的变化趋势（图 5），表明 H_2O_2 可以显著诱导茶树叶片中 *Csδ-OAT* 基因的表达。

总之，荧光定量 PCR 的分析结果表明茶树 *Csδ-OAT* 基因是一个受高盐、ABA、低温、干旱和氧化胁迫诱导表达的基因，该基因可能参与了多种逆境胁迫下茶树叶片的渗透调节过程。

2.4.2　*Csδ-OAT* 的组织特异性表达分析

以茶树根、茎、叶、芽、花和果实的 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR 分析，结果表明 *Csδ-OAT* 在花中的表达量最高，其次为叶片，而在其它组织中的表达量相当，且相对较低（图 6）。

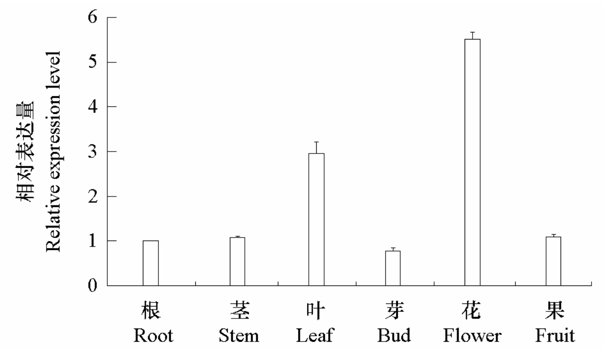

图 6　*Csδ-OAT* 基因在茶树不同组织中的表达量

Fig. 6　Relative expression of *Csδ-OAT* in different tissues of tea plant

3　讨论

植物为应对逆境胁迫而积累可溶性渗透物质，如脯氨酸、甜菜碱和糖醇等，作为小分子的渗透保护物质，其中脯氨酸是分布最为广泛的渗透调节剂（McCue & Hanson，1990）。δ-OAT 作为脯氨酸鸟氨酸合成途径中的关键酶，与植物逆境胁迫响应密切相关（Slama et al.，2006），但在茶树上还没有关于 δ-OAT 的研究报道。本研究中通过 RACE 技术克隆获得了茶树的 *δ-OAT* 基因，与其它植物的 δ-OAT 具有较高的同源性，其编码的氨基酸序列含有 δ-OAT 典型的 PLP 结合位点和抑制因子结合位点，属于乙酰鸟氨酸氨基转移酶家族，命名为 *Csδ-OAT*。对 Csδ-OAT 蛋白跨膜区预测显示该蛋白可能为跨膜蛋白，磷酸化位点预测结果显示 Csδ-OAT 蛋白含有多个磷酸化位点，可能与 Csδ-OAT 蛋白的活性调控有关。相关研究表明，磷酸化和去磷酸化是 ABA 信号通路中关键性的过程，低温、干旱和高盐等逆境胁迫能够促进植物体内 ABA 含量的增加，进而促进下游功能蛋白的磷酸化，从而使蛋白活化并参与植物逆境胁迫的响应（Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki，2006），因此推测 Csδ-OAT 蛋白的磷酸化位点可能与其逆境胁迫下蛋白活性有关。

已有的研究表明，*δ-OAT* 基因参与了植物对干旱、高盐和低温等非生物胁迫的响应（Armengaud et al.，2004）。焦蓉等（2011b）的研究表明烟草 *δ-OAT* 基因受干旱、高盐、低温和 ABA 胁迫诱导

表达；吴杨等（2009）的研究表明斑茅 *δ-OAT* 基因受干旱胁迫诱导表达。本研究的 qRT-PCR 结果亦表明茶树 *δ-OAT* 基因参与了茶树叶片对各种非生物胁迫（如高盐、干旱、低温、ABA 和氧化胁迫）的响应。其中，低温和氧化胁迫均出现了两次高峰，中间有略微降低，这可能与胁迫下脯氨酸积累的途径有关。目前关于植物响应胁迫时脯氨酸积累过程中两条合成途径谁占主导地位的争议还比较大。Delauney 等（1993）和 Sanchez 等（2001）的研究表明，胁迫下脯氨酸的合成途径与植物体内的氮素水平密切相关。此外，赵福庚和刘友良（1999）的研究发现，盐胁迫前 8 h 脯氨酸的积累主要受谷氨酸途径的调控，随后鸟氨酸途径占主导地位。因此，对于低温胁迫下 *Csδ-OAT* 在茶树叶片脯氨酸积累过程中的地位尚需做进一步的研究。

本研究中，通过 qRT-PCR 对 *Csδ-OAT* 基因在茶树不同组织中表达差异分析表明，茶树 *Csδ-OAT* 基因在不同组织中的表达量存在明显差异，在花中表达量最高，其次是叶片，而在其他组织中的表达量较低，这与张积森等（2009）报道的甘蔗 *δ-OAT* 基因在幼苗各组织中表达量相似，以及 Armengaud 等（2004）报道的苜蓿 *δ-OAT* 基因在根和顶芽中表达量最大，而在叶片和生殖器官中表达量较低的结果有所不同，表明不同植物相同组织中 *δ-OAT* 基因的表达存在差异。此外，鉴于茶树 *Csδ-OAT* 基因在花器官中相对较高的表达，以及前期研究所表明的脯氨酸参与了低温抑制茶树花粉萌发和花粉管生长的生理过程（Wang et al.，2012），推测 *Csδ-OAT* 基因在茶树花粉管低温胁迫响应中扮演重要角色，这有待进一步研究。

References

Armengaud P，Thiery L，Buhot N，Grenier-De M G，Savouré A. 2004. Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features. Physiologia Plantarum，120 (3)：442 – 450.

Chen Xuan，Peng Ying，Hao Shan，Wang Yu-hua，Fang Wan-ping，Zhang Cai-li，Li Xing-hui. 2011. The study on pollen germination *in vitro* of tea plant（*Camellia sinensis*）. Jiangsu Agricultural Sciences，(6)：233 – 235. (in Chinese)

陈 暄，彭 英，郝 姗，王玉花，房婉萍，张彩丽，黎星辉. 2011. 茶树花粉的离体萌发研究. 江苏农业科学，(6)：233 – 235.

Delauney A J，Hu C A，Kishor P B，Verma D P. 1993. Cloning of ornithine δ-aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by trans-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. Journal of Biological Chemistry，268 (25)：18673 – 18678.

Jiao Rong，Liu Guan-shan，Liu Hao-bao，Wang Shu-lin，Hou Na，Wang Quan-zhen，Jin Yi-rong，Liu Zhao-ke，Feng Xiang-guo，Hu Xiao-ming. 2011a. Cloning and expression analysis of orn-δ-aminotransferase gene *Ntδ-OAT* in *Nicotiana tabacum*. Journal of Plant Genetic Resources，12 (4)：588 – 593. (in Chinese)

焦 蓉，刘贯山，刘好宝，王树林，侯 娜，王全贞，靳义荣，刘朝科，冯祥国，胡晓明. 2011a. 普通烟草鸟氨酸转氨酶基因 *Ntδ-OAT* 的克隆与表达分析. 植物遗传资源学报，12 (4)：588 – 593.

Jiao Rong，Liu Hao-bao，Liu Guan-shan，Wang Shu-lin，Hou Na，Wang Quan-zhen，Liu Zhao-ke，Feng Xiang-guo，Hu Xiao-ming，Jin Yi-rong. 2011b. Discussion of accumulation of proline and its relationship with osmotic stress tolerance of plants. Chinese Agricultural Science Bulletin，(7)：216 – 221. (in Chinese)

焦 蓉，刘好宝，刘贯山，王树林，侯 娜，王全贞，刘朝科，冯祥国，胡晓明，靳义荣. 2011b. 论脯氨酸累积与植物抗渗透胁迫. 中国农学通报，(7)：216 – 221.

Livak K J，Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods，25 (4)：402 – 408.

McCue K F，Hanson A D. 1990. Drought and salt tolerance：Towards understanding and application. Trends in Biotechnology，8：358 – 362.

Quan Xian-qing，Zhang Yu-jie，Shan Lei，Bi Yu-ping. 2007. Advances in proline metabolism researches of higher plants. Biotechnology Bulletin，(1)：14 – 18. (in Chinese)

全先庆，张渝洁，单 雷，毕玉平. 2007. 高等植物脯氨酸代谢研究进展. 生物技术通报，(1)：14 – 18.

Roosens N H，Bitar F A，Loenders K，Angenon G，Jacobs M. 2002. Overexpression of ornithine-δ-aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants. Molecular Breeding，9 (2)：73 – 80.

Roosens N H，Thu T T，Iskandar H M，Jacobs M. 1998. Isolation of the ornithine-δ-aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology，117 (1)：263 – 271.

Sanchez E，Ruiz J M，Romero L. 2001. The response of proline metabolism to nitrogen deficiency in pods and seeds of French bean（*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike）plants. Journal of the Science of Food and Agriculture，81 (15)：1471 – 1475.

Slama I，Messedi D，Ghnaya T，Savoure A，Abdelly C. 2006. Effects of water deficit on growth and proline metabolism in *Sesuvium portulacastrum*. Environmental and Experimental Botany，56 (3)：231 – 238.

Stránská J，Kopečný D，Tylichová M，Snégaroff J，Šebela M. 2008. Ornithine-δ-aminotransferase. Plant Signaling & Behavior，3 (11)：929 – 935.

Stránská J，Tylichová M，Kopečný D，Snégaroff J，Šebela M. 2010. Biochemical characterization of pea ornithine-δ-aminotransferase：Substrate specificity and inhibition by di-and polyamines. Biochimie，92 (8)：940 – 948.

Sun Mei-lian，Wang Yun-sheng，Yang Dong-qing，Wei Zhao-ling，Gao Li-ping，Xia Tao，Shan Yu，Luo Yang. 2010. Reference genes for real-time fluorescence quantitative PCR in *Camellia sinensis*. Chinese Bulletin of Botany，(5)：579 – 587.（in Chinese)

孙美莲，王云生，杨冬青，韦朝领，高丽萍，夏　涛，单　育，骆　洋. 2010. 茶树实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的选择. 植物学报，(5)：579 – 587.

Wan Q，Xu R K，Li X H. 2012. Proton release by tea plant（*Camellia sinensis* L.）roots as affected by nutrient solution concentration and pH. Plant Soil and Environment，58 (9)：429 – 434.

Wang Xin-chao，Yang Ya-jun. 2003. Research progress on resistance breeding of tea plant. Journal of Tea Science，23 (2)：94 – 98. (in Chinese)

王新超，杨亚军. 2003. 茶树抗性育种研究现状. 茶叶科学，23 (2) ：94 – 98.

Wang Y H，Li X C，Zhu-Ge Q，Jiang X，Wang W D，Fang W P，Chen X，Li X H. 2012. Nitric oxide participates in cold-inhibited *Camellia sinensis* pollen germination and tube growth partly via cGMP *in vitro*. PLoS One，7 (12)：e52436.

Wu L Q，Fan Z M，Guo L，Li Y Q，Zhang W J，Qu L J，Chen Z L. 2003. Over-expression of an *Arabidopsis δ-OAT* gene enhances salt and drought tolerance in transgenic rice. Chinese Science Bulletin，48 (23)：2594 – 2600.

Wu Yang，He Li，Li Wei，Zhang Mu-qing. 2009. Cloning and sequence anaylisis of *δ-OAT* gene from *Erianthus arundinaceus*. Bulletin of Botanical Research，(5)：577 – 584. (in Chinese)

吴　杨，贺　俐，李　伟，张木清. 2009. 斑茅 *δ-OAT* 基因克隆及其序列分析. 植物研究，(5)：577 – 584.

Xie Hong，Yang Lan，Li Zhong-guang. 2011. The roles of proline in the formation of plant tolerance to abiotic stress. Biotechnology Bulletin，(2)：23 – 27. (in Chinese)

谢　虹，杨　兰，李忠光. 2011. 脯氨酸在植物非生物胁迫耐性形成中的作用. 生物技术通报，(2)：23 – 27.

Yamaguchi-Shinozaki K，Shinozaki K. 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. Annual Review of Plant Biology，57：781 – 803.

Zhang Ji-sen，Chen You-qiang，Guo Chun-fang，Li Wei，Que You-xiong，Ye Bing-ying，Chen Ru-kai，Zhang Mu-qing. 2009. Cloning of a water stress-induced *δ-OAT* gene from sugarcane. Chinese Journal of Tropical Crops，(8)：1062 – 1068. (in Chinese)

张积森，陈由强，郭春芳，李　伟，阙友雄，叶冰莹，陈如凯，张木清. 2009. 甘蔗水分胁迫响应的 δ – 鸟氨酸转氨酶基因克隆及分子特征分析. 热带作物学报，(8)：1062 – 1068.

Zhao Fu-geng，Liu You-liang. 1999. Advances in study on metabolism and regulation of proline in higher plants under stress. Chinese Bulletin of Botany，16 (5)：540 – 546. (in Chinese)

赵福庚，刘友良. 1999. 胁迫条件下高等植物体内脯氨酸代谢及调节的研究进展. 植物学通报，16 (5)：540 – 546.

Zhao Rui-xue，Zhu Hui-sen，Cheng Yu-hong，Dong Kuan-hu. 2008. Research progress on proline and its biosynthesis enzymes in plant. Pratacultural Science，(2)：90 – 97. (in Chinese)

赵瑞雪，朱慧森，程钰宏，董宽虎. 2008. 植物脯氨酸及其合成酶系研究进展. 草业科学，(2)：90 – 97.