

## 研究报告 Original Papers

茶树发育相关基因*CsARGOS*的克隆与表达特性分析

王文丽, 吴致君, 刘志薇, 崔新, 庄静\*

南京农业大学园艺学院, 茶叶科学研究所, 南京210095

**摘要:** 植物发育相关基因*ARGOS*基因受生长素诱导, 在植物的生长发育和激素调控方面起着重要的作用。本实验选取茶树品种‘龙井43’作为试验材料, 利用RT-PCR方法, 从茶树cDNA中克隆得到茶树*ARGOS*基因, 命名为*CsARGOS*。序列分析表明, *CsARGOS*基因开放阅读框为366 bp, 编码121个氨基酸。进化树分析显示, *CsARGOS*蛋白与双子叶植物的进化树关系相对较近, 与单子叶植物的进化树关系相对较远。序列多重比对显示, *CsARGOS*蛋白具有*ARGOS*蛋白的特征基序, C端均含有丰富的亮氨酸, N端亲水性氨基酸居多, 这些区域在物种中是相对保守的。氨基酸组分、理化性质、亲水性/疏水性、二级结构预测和无序化分析显示, 茶树*CsARGOS*是疏水性蛋白, 以随机卷曲为主, 无序化特征不明显。利用实时荧光定量PCR对*CsARGOS*基因在茶树中的表达进行检测, 分析结果表明在不同组织中, *CsARGOS*基因的表达水平从高到低依次为根>第三叶>第四叶>老叶>嫩茎>第二叶>第一叶; 不同激素处理下, *CsARGOS*的表达水平从高到低依次为GA<sub>3</sub>>SA>ABA>MeJA>IAA。

**关键词:** 茶树; *ARGOS*; 进化树分析; 不同组织; 激素处理

植物生长发育过程中一个重要的特征是器官的增大, 而器官增大的实质是细胞数目增多和细胞体积增大。调控植物器官增大的机制非常复杂, 各种外在环境条件, 如光、温度和营养条件等均会影响植物器官的增大。研究证实, 基因的调控在植物器官发生和增大过程中起关键作用(王洪峰等2013)。

*ARGOS* (auxin regulated gene involved in organ size) 是受生长素诱导的基因, 生长素处理能促进*ARGOS*基因的表达(Hu等2003)。*ARGOS*促进细胞的扩增, 影响了植物器官的大小(Guo等2014)。目前在模式植物拟南芥(Hu等2003; Feng等2011)和马铃薯(Kuluev等2011, 2014)中均发现和验证了*ARGOS*在受到生长激素诱导后表达产物能促进植物器官的增大。进一步研究证实, 植物中, *ARGOS*基因不仅促进了细胞数量的增加, 也延长了器官生长的时间, 它的过表达或缺失表达均能改变植物器官的大小和植物的生长速度(Shi等2015)。目前为止, 该基因尚未在茶树中报道过。

茶树最早产于中国。茶是世界三大健康饮品之一。众多研究结果表明, 长期饮茶, 有助于增强人体抗癌、抗氧化、减肥、抗心血管疾病和抗辐射等方面的能力(Mukhtar和Ahmad 1996; Soobrattee等2005; Wolfram等2006; Hodgson 2008)。作为叶用植物, 茶树具有重要的经济价值(姜含春等2004)。不同茶树品种叶片形态结构差异很大, 茶树叶片的大小与茶树光合特性和叶片功能性状相关(王峰等2016)。

本实验选用茶树品种‘龙井43’为材料, 从其cDNA中克隆得到一个*ARGOS*基因, 命名为*CsARGOS*。进一步对该基因推导的氨基酸序列进行序列比对、理化性质和亲/疏水性、无序化和二级结构等方面的分析。利用荧光定量PCR方法检测了*ARGOS*基因在茶树‘龙井43’不同组织和激素处理下的表达水平。本实验为进一步研究茶树品种叶片发育以及不同激素处理下*CsARGOS*响应机制提供了实验基础。

## 材料与方法

## 1 植物材料

供试材料选取种植在南京农业大学茶叶科学研究所的两年生茶树品种‘龙井43’ (*Camellia sinensis* cv. ‘Longjing43’) 扦插盆栽幼苗, 处理时间为2016年4月。取‘龙井43’扦插盆栽幼苗的幼嫩叶片, 提取总RNA, 反转录成cDNA, 用于基因克隆的模板。

对正常生长的健康两年生茶树叶片分别喷施脱落酸(0.1 mmol·L<sup>-1</sup> ABA)、茉莉酸甲酯(1 mmol·L<sup>-1</sup> MeJA)、水杨酸(1 mmol·L<sup>-1</sup> SA)、赤霉素(1 mmol·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>)和吲哚乙酸(1 mmol·L<sup>-1</sup> IAA)处理2 h后取样, 以未做任何处理的茶树叶片为空白对照。另选取

收稿 2016-09-02 修定 2016-10-24

资助 国家自然科学基金(31570691)。

\* 通讯作者(E-mail: zhuangjing@njau.edu.cn)。

多株‘龙井43’茶苗的第一叶混样、第二叶混样、第三叶混样、第四叶混样、老叶混样、嫩茎混样和根混样作为不同组织基因表达材料。对上述所取得的样品, 进行总RNA的提取, 反转录为cDNA, 用于实时荧光定量的模板。

## 2 总RNA的提取和cDNA的合成

选用Quick RNA Isolation Kit (北京华越洋公司) 试剂盒提取茶树叶片和嫩茎的总RNA, 选用Biotake Corporation (南京华普生物科技有限公司) 试剂盒提取茶树根的总RNA。选用Nanodrop ND 1000 (上海谱元仪器有限公司) 检测提取的茶树RNA样品浓度。检测RNA质量采用1.2%凝胶电泳。总RNA的cDNA反转录选用PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser CsARGOS (大连TaKaRa公司) 试剂盒。

## 3 茶树CsARGOS基因克隆

基于本实验室课题组茶树转录组数据(Wu等2014), 筛选到一个茶树ARGOS转录本序列, 根据此序列设计了一对克隆引物(CsARGOS-QF: 5'-ATGGACGTGAGAATGAAGAATAAC-3'; CsARGOS-QR: 5'-TTACATATATGTATAAGTAGCAGTA-3')。扩增体系是: 10 μL 2×Taq Plus Master Mix酶、7 μL ddH<sub>2</sub>O、1 μL模板、CsARGOS-QF/R引物各1 μL。反应条件为: 95°C预变性5 min; 95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 60 s, 共35个循环; 72°C 10 min。之后对PCR产物进行电泳分离和回收。选用pMD19-T载体连接回收片段, 随即转化到大肠杆菌上。选取检测出现目的条带的菌液, 委托南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。

## 4 生物信息学分析

氨基酸序列的多重比对和亲疏水性分析是利

用DNAMAN 6.0软件来完成的。氨基酸的组成以及理化性质是利用在线工具包(SMS) (<http://www.bio-soft.net/sms>)和ExPASy-ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>)来分析的。利用MEGA 5.0 (Tamura等2011)软件来构建系统发育树。二级结构预测在SOPMA网站(<http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa>)上进行。使用Origin 6.0软件进行荧光定量PCR数据的分析和图表绘制。

## 5 茶树CsARGOS基因的表达特性分析

按照SYBR Premix Ex Taq试剂盒(大连TaKaRa公司)的操作说明来进行实时荧光定量PCR (quantitative real time RT-PCR)。CFX96™ real-time PCR system作为荧光定量PCR平台。CsARGOS检测引物为CsARGOS-J1F (5'-TTCCCGTTCAGTATAGAGTCGTCGC-3')和CsARGOS-J1R (5'-ATCATAAGCACAGCCAGAATCCCAA-3')。选择茶树的TBP基因作为组织表达和激素处理的内参基因(Wu等2016), 引物分别为TBP-JF (5'-GGCGGATCAAGTGGTTGGAAGGGAG-3')和TBP-JR (5'-ACGCTTGGGATTGTATTCCGGCATT-3'), 采用2<sup>-ΔΔCt</sup>方法进行相对定量计算(Schäffer等2001)。

## 实验结果

### 1 茶树CsARGOS基因的克隆

选择正常生长的‘龙井43’扦插幼苗嫩叶, 提取总RNA, 之后反转录成cDNA模板。利用引物CsARGOS-QF和CsARGOS-QR进行PCR扩增反应, 对扩增片段进行测序。结果显示茶树CsARGOS基因开放阅读框长度为366 bp, 共编码121个氨基酸(图1)。从图中方框部分可以看出C端含有大量的亮氨酸, 推测该蛋白可能参与了信号转导(Hu等2003)。

```

1  atggacgtgagaatgaagaataacaacaataaggcagctgctcctttttcttttcctaaa
   M D V R M K N N N N K A A A P F S F P K
61  atgaggcctactactactcctccttttggtggttgatggaaaaaagtgttgatcatcgg
   M R P T T T P P L V V D G K K V L Y H R
121 tctttctcgcaaggcaaggcagccagaagaatttccggttcagtatagagtcgctcg
   S F S Q G Q G H A R R I F P F S I E S S
181 ctactactcgtttgtctgacagcttcgctgctgattctgccactgattcttcgccattg
   [L L L V C L T A S L L I L P L I L P P L]
241 ccgccaccgctttcatgctgctgctgctcctccattgggattctggctgctgctatgata
   [P P P P F M L L L P I G I L A V L M I]
301 ttggctttatgcttctctgatgtccgcataattactactactgctacttatacatat
   [L] A F M P S S D V R H I T T T A T Y T Y
361 atgtaa
   M *
    
```

图1 茶树CsARGOS核苷酸序列与推测的氨基酸序列

Fig.1 The nucleotide and amino acid sequences of CsARGOS from tea plant

## 2 茶树CsARGOS蛋白氨基酸序列比对

选取拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、白菜(*Brassica rapa*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)和玉米(*Zea mays*)四个代表性物种中的ARGOS同源蛋白与茶树CsARGOS蛋白进行序列多重比对(图2)。结果显示,4个蛋白氨基酸序列与茶树CsARGOS的一致性

分别为39.85%、37.68%、47.97%和32.79%。不同植物间ARGOS蛋白序列的C端都含有丰富的亮氨酸(图中方框部分),即C端主要由疏水性氨基酸组成。另发现,除单子叶植物玉米外,双子叶植物中N端亲水性氨基酸较多,推测这些区域在物种中是相对保守的。

茶树CsARGOS	.....MDVRMKNNNKAAAPFSFPKMRPTTTPPLVV.....DGKKVLYHRSFSA	45
拟南芥ABQ85120.1	MIREISNLQKDIINIQDSYSNNRVMDVG...RNNRKNMSFRSSF.....EKSKQLRRSFA	45
玉米AEQ59626.1	.....MHLDDLRQDRGAAA...HTGSRSRKPPPE.....LAAAAAAAAGVPA	42
番茄ACN38309.1	.....MNMDMESSEAKLRSPKGFINLEEHQQYFNFI...MEGNKMEHKRSFTQGH	47
白菜ACN38308.1	MIRKTPNLQNDIINIQERYSNLVMDDVGGRRNSRKNVNFRRPPAMTSENSKHELRRRTESS	62
茶树CsARGOS	QGHARRIFPFSIESLLLVCLTASLLILPLILPPLPPPFMLLLLPTGTLAVLMIIFAFMPSSD	108
拟南芥ABQ85120.1	KRMMIPANYFSLESFLVLVGLTASLLILPLVLPPLPPPFMLLLVPTGIMVLLVVLAFMPSSH	118
玉米AEQ59626.1	SSTAATAHLGPEAAALACVTATLLLPVLPPLPPPFMLLLVPTGIMVLLVVLAFMPSSDA	105
番茄ACN38309.1	GKKMLSMNYFSLESIILLGLTASLLILPLMLPPLPPPFMLLLVPTGIMVLLVVLAFMPSPN	109
白菜ACN38308.1	KRLMIPANYFSLESFLVLVGLTASLLILPLVLPPLPPPFMLLLVPTGIMVLLVVLAFMPSSS	125
茶树CsARGOS	VRHITT.TATYTY	120
拟南芥ABQ85120.1	S.IANT.DVTCNF	129
玉米AEQ59626.1	RAAVATPTSSASY	118
番茄ACN38309.1	...VR..NVTCSY	117
白菜ACN38308.1	S.RAK..DVTPTF	135

图2 茶树CsARGOS蛋白与其他物种氨基酸序列的多重比对

Fig.2 Multiple alignment of the amino acid sequences of CsARGOS and ARGOS proteins of other species

## 3 茶树CsARGOS蛋白进化树分析

为了进一步探究茶树CsARGOS蛋白与其他物种的同源进化关系。现选用拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、白菜(*Brassica rapa*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)、玉米(*Zea mays*)、水稻(*Oryza sativa*)、可可(*Theobroma cacao*)、油菜(*Brassica napus*)、麻疯树(*Jatropha curcas*)、芝麻(*Sesamum indicum*)、

海枣(*Phoenix dactylifera*)和胡杨(*Populus euphratica*)共11个物种,与茶树CsARGOS蛋白构建进化树关系图(图3)。结果显示:ARGOS蛋白在茶树中与双子叶植物可可、麻风树和胡杨的进化树关系相近,与单子叶植物玉米和水稻的进化树关系相对较远。另发现拟南芥、白菜和油菜三个同样来源于十字花科物种的ARGOS蛋白进化树关系相近。

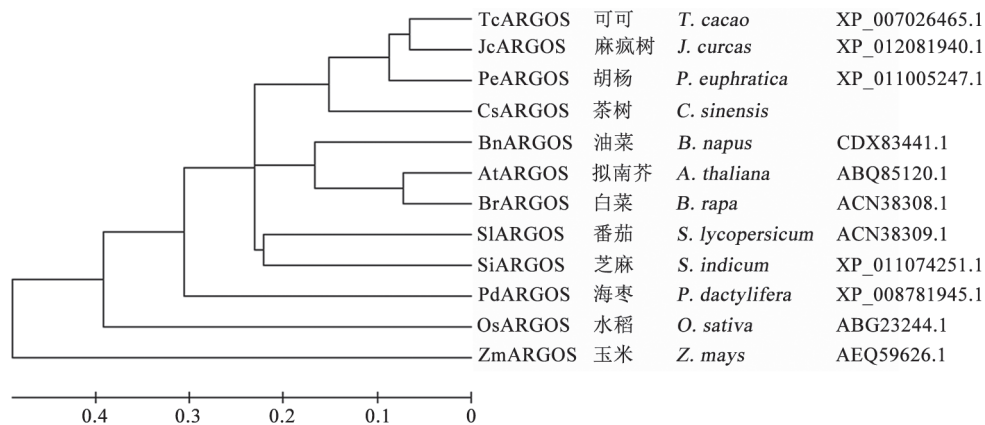


图3 茶树CsARGOS蛋白的进化树分析

Fig.3 Phylogenetic tree analysis of tea plant CsARGOS protein



#### 4 茶树CsARGOS蛋白氨基酸的理化性质分析

CsARGOS蛋白组成成分和理化性质的分析采用Gasteiger等(2003)的方法(表1)。结果显示上述植物的ARGOS蛋白氨基酸残基数在118~146之间, 相对分子量为(1.1~1.7)×10<sup>4</sup> Da。理论等电点(pI)除了番茄和玉米在8左右, 其余的均在9.30~10.91之

间。酸性氨基酸的平均含量在5%左右, 碱性氨基酸的平均含量在11%左右, 芳香族氨基酸和脂肪族氨基酸平均含量分别为7%和29%。各个物种之间的理化性质相差不大。主要平均疏水特性(grand average of hydropaticity)在蛋白质可溶性预测中除了玉米为0.748, 其余的均在0.3左右。

表1 不同植物中ARGOS氨基酸组成成分及理化性质分析

Table 1 Comparison of composition and chemical characterization of amino acid sequences of ARGOS among the different plants

植物	Genbank登录号	氨基酸数/个	相对分子质量/Da	理论等电点	碱性氨基酸/%	酸性氨基酸/%	芳香族氨基酸/%	脂肪族氨基酸/%	总平均疏水性
茶树( <i>C. sinensis</i> )	-	121	13 432.2	10.21	11	3	8	28	0.440
拟南芥( <i>A. thaliana</i> )	ABQ85120.1	130	14 694.5	9.89	11	6	7	29	0.246
番茄( <i>S. lycopersicum</i> )	ACN38309.1	118	13 470.2	7.91	10	7	8	29	0.335
白菜( <i>B. rapa</i> )	ACN38308.1	136	15 274.2	10.91	12	5	7	29	0.160
玉米( <i>Z. mays</i> )	AEQ59626.1	119	11 753.9	8.02	8	4	2	29	0.748
可可( <i>T. cacao</i> )	XP_007026465.1	126	14 273.2	10.20	12	6	9	33	0.497
亚麻芥( <i>C. sativa</i> )	XP_010508344.1	146	16 119.9	10.38	10	5	5	28	0.229
麻疯树( <i>J. curcas</i> )	XP_012081940.1	142	15 730.6	10.10	11	5	7	27	0.213
芝麻( <i>S. indicum</i> )	XP_011074251.1	134	15 217.1	9.95	16	6	6	28	0.130
海枣( <i>P. dactylifera</i> )	XP_008781945.1	121	13 674.1	9.30	10	7	9	29	0.282
胡杨( <i>P. euphratica</i> )	XP_011005247.1	131	14 670.4	9.74	12	6	5	28	0.266

-表示尚未取得登录号。

#### 5 茶树CsARGOS蛋白推导的氨基酸亲/疏水性分析

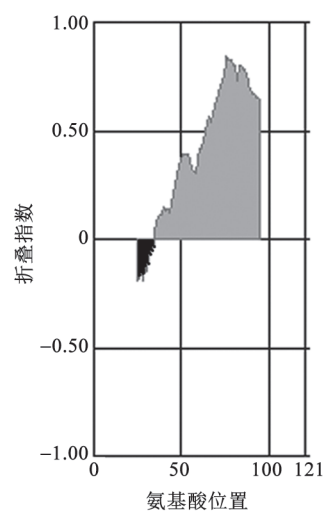
CsARGOS基因推导的氨基酸序列亲水性/疏水性分析是借助DNAMAN 6.0软件完成的。结果显示, 该蛋白疏水性最强的位点是在第63位的亮氨酸(Leu), 其次是96~99区域, 依次为丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、蛋氨酸(Met); 亲水性最强的位点是8位的天冬酰胺(Asn), 其次是4位的精氨酸(Arg)。总的来说, 大多数的氨基酸属于疏水性氨基酸, 推测ARGOS是疏水性蛋白。

#### 6 茶树CsARGOS蛋白固有无序化预测与分析

利用FoldIndex程序对茶树CsARGOS蛋白氨基酸序列进行折叠的无序化分析。如图4所示, CsARGOS无序化区域在整个氨基酸序列中只有一个区域, 无序化区域含有氨基酸数为34个, 无序化比例为28.10%。所以ARGOS无序化程度不是很明显。

#### 7 茶树CsARGOS蛋白推导的二级结构分析

为了对CsARGOS蛋白进行进一步的分析, 利用SOPMA网站对茶树CsARGOS蛋白的二级结构进



MDVRMKNNNN KAAAPFSFPK MRPTTTPPLV  
VDGKKVLYHR SFSQGGHAR RIFPFSIESS  
 LLLVCLTASL LILPLILPPL PPPPFMLLLL  
 PIGILAVLMI LAFMPSSDVR HITTATYTY M

图4 茶树CsARGOS折叠状态的分析

Fig.4 Analysis of the folding state of CsARGOS  
 有下划线的是无序状态氨基酸, 无下划线的是有序状态氨基酸。

行预测和分析。结果显示: CsARGOS含有13.22%的 $\alpha$ -螺旋( $\alpha$ -helix), 65.29%的随机卷曲(random coil)和21.49%的延伸主链(extended strand), 不存在 $\beta$ -折叠( $\beta$ -turn)。CsARGOS主要组成部分为随机卷曲、延伸主链和 $\alpha$ -螺旋。

### 8 茶树CsARGOS基因在不同组织中的表达分析

通过荧光定量PCR, 检测了茶树中CsARGOS基因的组织表达情况(图5)。结果显示, CsARGOS基因在不同组织中均有表达。在根中表达量最高, 其次是叶。随着叶的发育, CsARGOS的表达量呈现先升高后降低的趋势, 在第一叶中表达量最低, 第三叶中表达量最高。第二叶、第三叶、第四叶和老叶中的表达量分别为第一叶的1.36、1.85、1.54和1.43倍。总的看来, CsARGOS基因在不同组织中的表达水平依次为根>第三叶>第四叶>老叶>嫩茎>第二叶>第一叶。

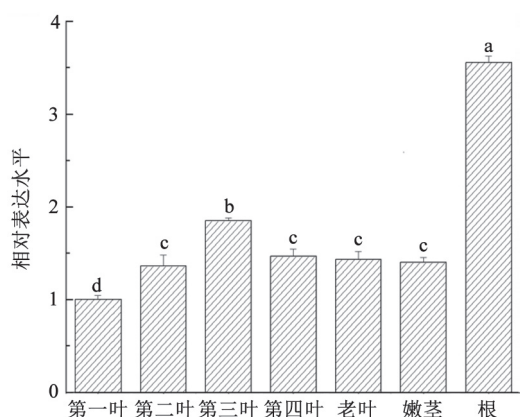


图5 CsARGOS基因在茶树不同组织中的表达分析  
Fig.5 Expression analysis of CsARGOS gene in different tissues of tea plant

不同小写字母表示在0.05水平上差异显著, 图6同此。

### 9 茶树CsARGOS基因在不同激素处理下的表达情况

为了研究CsARGOS基因在不同激素诱导下的表达情况, 分别用SA、GA<sub>3</sub>、MeJA、ABA和IAA共五种激素处理茶树。结果显示(图6), 在不同激素处理下, CsARGOS均表现出了不同程度的上调, 其中在GA<sub>3</sub>处理下, CsARGOS的表达量最高, 为对照的4.21倍。其次是SA, 表达量为对照的3.55倍。ABA诱导下的表达量为对照的2.77倍。MeJA和IAA处理下表达量分别为对照的1.76和1.71倍。总的看来, CsARGOS在不同激素处理下的表达水平从高到低依次为GA<sub>3</sub>>SA>ABA>MeJA>IAA。

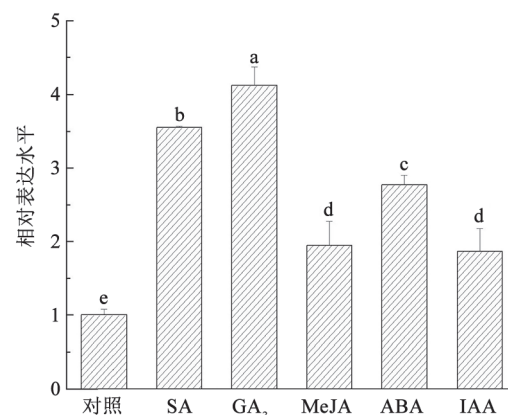


图6 CsARGOS基因在茶树不同激素处理下的表达分析  
Fig.6 Expression analysis of CsARGOS gene under different hormonal treatments of tea plant

## 讨 论

细胞生长、细胞分裂和细胞分化三者协同调控植物形态特征的发育。器官的大小是植物形态特征发育的最直接表现, 参与发育的信号调控分子机制已经比较清楚(Mizukami 2001)。ARGOS是受生长素诱导的基因, 目前在模式植物中发现其具有调控植物器官大小方面的功能。

在拟南芥、白菜、水稻中, ARGOS的过表达和缺失表达能分别扩增和减弱地上部分器官的大小(Hu等2003; 王保2006; Wang等2010)。在Hu等(2003)的研究中发现拟南芥ARGOS是单拷贝基因, ARGOS受生长素诱导后, 通过促使细胞数目增多和延长发育时间来调控器官大小。大白菜中的ARGOS基因转入拟南芥, 可促进拟南芥的叶、花和株高显著的增大或增高, 其调控机制是促进了转基因植物细胞数目的增多而非促进单个细胞体积的增大(Wang等2010)。转基因马铃薯中, ARGOS基因的表达水平受DMV (dahlia mosaic virus)启动子诱导, 能促进马铃薯快速生长, 使叶片和花朵明显地增大, 这些表型均能稳定地遗传给T<sub>2</sub>代的转基因马铃薯(Kuluev等2011)。水稻的ARGOS基因转入拟南芥中, 通过诱导细胞数目增多和促进单个细胞体积增大来扩增器官, OsARGOS基因在水稻的各个组织中都能检测到, 尤其是幼嫩的部位。它的表达在种子时期受ABA和细胞分裂素的诱导, 过量表达的OsARGOS基因在拟南芥中可引起拟南芥侧生器官增大(王保2006)。

本实验中, 茶树CsARGOS蛋白与双子叶植物

中同源蛋白的进化树关系相对较近, 与单子叶植物中同源蛋白的进化树关系相对较远。Hu等(2003)预测ARGOS蛋白富含亮氨酸的C端区域可能是一个假定的跨膜区, 该蛋白极有可能参与了信号的转导。茶树CsARGOS蛋白的C端同样富含亮氨酸, 推测CsARGOS蛋白也可能参与了信号转导。组织表达分析显示, CsARGOS在各个组织中均有表达, 与Hu等(2003)的实验中通过GUS染色, ARGOS基因在拟南芥的各个组织均有表达的结论相一致。在叶片中, 随着叶片的伸展, CsARGOS基因的表达量呈先上升再下降的趋势, 在第三叶中表达量最高。前三叶中, CsARGOS基因表达量为第三叶>第二叶>第一叶, CsARGOS基因可能在调控叶片细胞膨胀上发挥着重要作用。在第四叶和老叶中, CsARGOS基因的表达水平相接近, 且低于第三叶。因此, 我们推测CsARGOS基因可能仅在调控幼嫩组织方面功能显著, 这与王保(2006) OsARGOS基因在水稻的各个组织中均有表达, 且在幼嫩组织含量高的结论相一致。CsARGOS基因在根部表达量最高和Guo等(2014)的结论中ZARI基因在根部表达量明显高于其他器官的结论相一致。

激素在植物生长发育过程中起着重要的作用, 它们通过信号转导, 启动或阻遏下游相关基因的表达, 调控茶树的生长(岳川等2012; 汪芳俊等2015)。本实验中不同激素处理下, CsARGOS基因比对照均表现出不同程度的上升。王保(2006)在水稻OsARGOS启动子和基因的5'非编码区的顺式作用元件克隆中发现, 这些区域中存在AuRE、GATTbox等激素调节的顺式作用元件。在本实验中, 由于CsARGOS基因的相对表达水平受激素诱导后上调, 推测CsARGOS基因的启动子和5'非编码区也存在一些激素调节相关的顺式作用元件。

本实验首次在茶树中克隆了CsARGOS基因, 并研究了该基因在不同组织和不同激素处理下的表达情况, 预测CsARGOS基因在调控茶树器官大小方面起着重要的作用。然而, 对CsARGOS编码蛋白的结构和功能还有待进一步地研究和证实。

### 参考文献

- Feng GP, Qin ZX, Yan JZ, Zhang XR, Hu YX (2011). *Arabidopsis ORGAN SIZE RELATED1* regulates organ growth and final organ size in orchestration with ARGOS and ARL. *New Phytol*, 191 (3): 635–646
- Gasteiger E, Gattike A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel D, Bairoch A (2003). ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*, 31 (13): 3784–3788
- Guo M, Rupe MA, Wei J, Winkler C, Goncalves-Butruille M, Weers BP, Cerwick SF, Dieter JA, Duncan KE, Howard RJ, et al (2014). Maize ARGOS1 (ZARI) transgenic alleles increase hybrid maize yield. *J Exp Bot*, 65 (1): 249–260
- Hodgson JM (2008). Tea flavonoids and cardiovascular disease. *Asia Pac J Clin Nutr*, 17 (s1): 288–290
- Hu YX, Xie Q, Chua NH (2003). The *Arabidopsis* auxin-inducible gene ARGOS controls lateral organ size. *Plant Cell*, 15 (9): 1951–1961
- Jiang HC, Wang XG, Zhao HY, Jiang SH (2004). Studies on the competitive capacity and tactics of Chinese tea on the overseas market with SWOT method. *J Tea Sci*, 24 (3): 159–165 (in Chinese with English abstract) [姜含春, 汪小谷, 赵红鹰, 姜苏含(2004). 试用“SWOT”法探讨我国茶叶国际市场竞争力及其对策. *茶叶科学*, 24 (3): 159–165]
- Kuluev BR, Knyazev AV, Iljassowa AA, Chemeris AV (2011). Constitutive expression of the ARGOS gene driven by dahlia mosaic virus promoter in tobacco plants. *Russ J Plant Physiol*, 58 (3): 507–515
- Kuluev BR, Knyazev AV, Postrigan BN, Chemeris AV (2014). The creation of transgenic tobacco plants expressing fragments of the ARGOS and NiEXPA4 genes in antisense orientation. *Russ J Genet*, 50 (1): 37–44
- Mizukami Y (2001). A matter of size: Developmental control of organ size in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 4 (6): 533–539
- Mukhtar H, Ahmad N (1996). Green tea in chemoprevention of cancer. *Toxicol Sci*, 52 (suppl 1): 111–117
- Schäffer AA, Aravind L, Madden TL, Shavirin S, Spouge JL, Wolf YI, Koonin EV, Altschul SF (2001). Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. *Nucleic Acids Res*, 29 (14): 2994–3005
- Shi J, Habben JE, Archibald RL, Drummond JB, Chamberlin MA, Williams RD, Lafitte HR, Weers BP (2015). Overexpression of ARGOS genes modifies plant sensitivity to ethylene, leading to improved drought tolerance in both *Arabidopsis* and maize. *Plant Physiol*, 169 (1): 266–282
- Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutat Res*, 579 (1): 200–213
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, 28 (10): 2731–2739
- Wang B (2006). Isolation of OsARGOS gene and function analysis in *oryza sativa* [PhD thesis]. Tai'an, Shandong: Shandong Agriculture University (in Chinese with English abstract) [王保(2006). 水稻OsARGOS基因的分离和功能分析(博士论文). 山东泰安: 山东农业大学]
- Wang B, Zhou X, Xu F, Gao JW (2010). Ectopic expression of a Chi-



- nese cabbage *BrARGOS* gene in *Arabidopsis* increases organ size. *Transgenic Res*, 19 (3): 461–472
- Wang F, Chen YZ, Wang XP, You ZM, Chen CS (2016). Comparison of leaf functional and photosynthetic characteristics in different tea cultivars. *J Tea Sci*, 36 (1): 285–292 (in Chinese with English abstract) [王峰, 陈玉真, 王秀萍, 尤志明, 陈常颂(2016). 不同品种茶树叶片功能性状及光合特性的比较. *茶叶科学*, 36 (1): 285–292]
- Wang FJ, Hou SN, Xu NJ, Sun X (2015). Reearch progress on phytohormone in algae. *Plant Physiol J*, 51 (12): 2083–2090 (in Chinese with English abstract) [汪芳俊, 侯赛男, 徐年军, 孙雪(2015). 藻类植物激素研究进展. *植物生理学报*, 51 (12): 2083–2090]
- Wang HF, Wang HW, Yang SX, He YK (2013). Research progress of regulators of organ size in plants. *Plant Physiol J*, 49 (5): 437–444 (in Chinese with English abstract) [王洪峰, 王宏伟, 杨素欣, 何玉科(2013). 植物器官大小调控因子研究进展. *植物生理学报*, 49 (5): 437–444]
- Wolfram S, Wang Y, Thielecke F (2006). Anti-obesity effects of green tea: from bedside to bench. *Mol Nutr Food Res*, 50 (2): 176–187
- Wu ZJ, Li XH, Liu ZW, Xu ZS, Zhuang J (2014). *De novo* assembly and transcriptome characterization: novel insights into catechins biosynthesis in *Camellia sinensis*. *BMC Plant Biol*, 14: 277
- Wu ZJ, Tian C, Jiang Q, Li XH, Zhuang J (2016). Selection of suitable reference genes for qRT-PCR normalization during leaf development and hormonal stimuli in tea plant (*Camellia sinensis*). *Sci Rep*, 6: 19748
- Yue C, Zeng JM, Zhang ZF, Wang XC, Cao HL (2012). Research progress in the phytohormone of tea plant (*Camellia sinensis*). *J Tea Sci*, 32 (5): 382–392 (in Chinese with English abstract) [岳川, 曾建明, 章志芳, 王新超, 曹红利(2012). 茶树中植物激素研究进展. *茶叶科学*, 32 (5): 382–392]

## Cloning and expression profiles analysis of development related gene *CsARGOS* in tea plant (*Camellia sinensis*)

WANG Wen-Li, WU Zhi-Jun, LIU Zhi-Wei, CUI Xin, ZHUANG Jing\*

*Tea Science Research Institute, College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China*

**Abstract:** *ARGOS* gene is induced by auxin and plays important roles in plant development and hormonal regulation. In this study, a gene encoding ARGOS-like protein was cloned by RT-PCR method using a cDNA template from tea plant (*Camellia sinensis*) cultivar ‘Longjing43’. This gene is named as *CsARGOS*. Sequence analysis showed that the open reading frame of *CsARGOS* gene has 366 bp length, which encoding 121 amino acids. Analysis of phylogenetic tree showed that *CsARGOS* protein has high similarity with dicotyledon plants and has low similarity with the monocotyledon plant. Multiple alignments showed that *CsARGOS* protein contains Leu-rich domain in the C-terminal and rich hydrophilic amino acids in N-terminal, which are the characterized motifs of ARGOS-type protein. Amino acid composition, physical and chemical properties, hydrophilicity/hydrophobicity, secondary structure predicted and disordered residues of *CsARGOS* protein were analyzed. The disordered residues of *CsARGOS* protein are not obvious. Most amino acids of *CsARGOS* protein are hydrophobic. The secondary structure of *CsARGOS* is mainly random coil. The expression levels of *CsARGOS* gene in tea plant were detected using quantitative real-time PCR analysis. In different tissues, the successive order of *CsARGOS* gene expression levels was root, the third leaf, the fourth leaf, old leaf, stem, the second leaf, and the first leaf. In different hormonal treatments, the successive order of *CsARGOS* gene expression levels was GA<sub>3</sub>, SA, ABA, MeJA, and IAA.

**Key words:** *Camellia sinensis*; ARGOS; phylogenetic tree analysis; different tissues; hormonal treatment

Received 2016-09-02 Accepted 2016-10-24

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31570691).

\*Corresponding author (E-mail: zhuangjing@njau.edu.cn).