

刘悦, 曲浩, 田易萍, 等. 转录组测序分析外源水杨酸诱导茶树热激蛋白基因的响应[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(4): 607-614.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.04.004

转录组测序分析外源水杨酸诱导茶树热激蛋白基因的响应

刘悦, 曲浩, 田易萍, 陈春林, 冉隆珣, 陈林波

(云南省农业科学院茶叶研究所/云南省茶树种质资源创新与配套栽培技术工程研究中心/云南省茶学重点实验室, 昆明 666201)

摘要: 水杨酸是诱导植物抗性机制中重要的信号分子, 外源喷施水杨酸能够调控多种防御相关蛋白质, 提升农作物的抗病能力。开展外源水杨酸诱导茶树抗性机制的研究能够挖掘抗病基因, 为茶树抗病育种提供分子基础。本研究采集外源喷施水杨酸 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h 的茶树叶片进行转录组测序与分析, 结果表明, 外源喷施水杨酸 6 h、12 h、24 h、48 h 时茶树叶片内差异表达基因数量分别为 9 360 个、3 399 个、596 个、115 个, 外源水杨酸处理后各时间点均发生差异表达的基因共 604 个。KEGG 功能富集结果显示, 处理后 6 h 时富集于植物激素信号转导、植物-病原菌互作、核糖体、剪接体和碳代谢通路上的差异表达基因数量分别为 95 个、73 个、121 个、94 个、154 个。差异表达基因中有 12 个热激因子基因、40 个热激蛋白基因和 12 个 WRKY 家族转录因子基因上调表达。处理 48 h 后, 无上调表达的热激因子基因, 但仍有 28 个热激蛋白基因上调表达。病程相关蛋白基因在检测阶段均上调表达。外源水杨酸的诱导作用在处理 6 h 时最为明显, 并且引起了大量热激蛋白的响应。本研究结果为开展外源水杨酸诱导茶树抗病机制和茶树抗病分子育种研究提供了参考。

关键词: 外源水杨酸; 茶树; 转录组; 差异表达基因; 热激蛋白

中图分类号: S571.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)04-0607-08

Transcriptome analysis of the response of heat shock protein encoding genes induced by salicylic acid in tea plants

LIU Yue, QU Hao, TIAN Yi-ping, CHEN Chun-lin, RAN Long-xun, CHEN Lin-bo

(Tea Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences/Yunnan Technology Engineering Research Center of Tea Germplasm Innovation and Supporting Cultivation/Yunnan Provincial Key Laboratory of Tea Science, Kunming 666201, China)

Abstract: Salicylic acid is an important signal molecule in mechanism of plant resistance induction. Externally spraying salicylic acid can regulate multiple defense-related proteins and improve the resistance of crops. Research on the resistance mechanism of tea plants induced by exogenous salicylic acid can explore resistance genes and provide molecular basis for resistance breeding of tea plants. In this study, transcriptome sequencing and analysis were conducted on tea leaves col-

lected at 0 h, 6 h, 12 h, 24 h and 48 h of spraying exogenous salicylic acid. The results showed that numbers of differentially expressed genes in tea leaves at 6 h, 12 h, 24 h and 48 h of spraying exogenous salicylic acid were 9 360, 3 399, 596 and 115 respectively, 604 genes were differentially expressed at each time point after exogenous salicylic acid treatment. Results of KEGG functional en-

收稿日期: 2023-04-21

基金项目: 国家茶叶产业技术体系项目(CARS-19); 世界大叶茶技术创新中心建设及成果产业化项目(202102AE090038)

作者简介: 刘悦(1990-), 女, 黑龙江七台河人, 硕士, 助理研究员, 研究方向为茶树遗传育种。(E-mail) liuyue0504@126.com

通讯作者: 陈林波, (E-mail) chenlinbo2002@sina.com

richment showed that 95, 73, 121, 94 and 154 differentially expressed genes were respectively enriched in plant hormone signal transduction, plant-pathogen interaction, ribosome, spliceosome and carbon metabolic pathways six hours after treatment. Among the differentially expressed genes, 12 genes of heat shock protein transcriptional factors, 40 genes of heat shock proteins and 12 transcriptional factor genes of WRKY family were up-regulated. No up-regulated gene of HSP transcriptional factors was found after 48 h of treatment, but 28 HSP genes were upregulated. Expression of genes encoding pathogenesis related protein were up-regulated at the detection stage. The induction effect of exogenous salicylic acid was the most obvious at six hours of treatment and caused many responses of heat shock protein. The results of the study provided a reference for the research of disease-resistance mechanism of tea tree induced by exogenous salicylic acid and molecular breeding for disease resistance of tea tree.

Key words: exogenous salicylic acid; tea plant; transcriptome; differentially expressed gene; heat shock protein

水杨酸(Salicylic acid)是一种重要的植物激素,是介导植物免疫和生长的关键信号分子,在植物体内广泛存在^[1-2]。水杨酸可以被致病相关基因 *NPR1*、*NPR3*、*NPR4* 感知,进而刺激水杨酸下游基因,诱导植物免疫应答^[3]。在植物中水杨酸通过 2 条不同途径合成,即苯丙氨酸解氨酶和异分支酸合成酶途径。外源水杨酸能够诱导多种植物产生防御反应,如水稻、拟南芥^[4-5]。茶叶的质量安全一直是消费者关注的问题,因此茶树的病虫害绿色防控技术研究尤为重要。外源水杨酸是一种绿色防控药剂,但有关外源水杨酸在茶树上的应用和作用机制方面的研究较少。

植物的生长、发育、产量和质量受到各种生物因素影响,如致病细菌、真菌、病毒和线虫,能够导致植物活力、生长量和产量降低。外源水杨酸能够诱导植物抵御多种病害,同时促进植物中大量与病程相关的蛋白质积累,其中包括几丁质酶和 1,3- β -葡聚糖酶^[6]。炭疽病菌感染茶树的过程中,水杨酸相关基因上调表达,叶面水杨酸发生积累,这在茶树抵抗炭疽病的过程中发挥关键作用^[7]。对水稻稻瘟病的防控同样可以使用外源水杨酸^[8]。外源水杨酸能够通过改善甜菜的光合特性和抗氧化防御系统来缓解氟磺胺草醚毒性^[9]。外源水杨酸还可以改善热胁迫诱导的紫花苜蓿损伤,提高其生长和光合效率^[10]。此外,水杨酸通过与其他参与调节细胞分裂和扩张的激素相互作用来调控植物的生长发育,例如与生长素、乙烯的互作^[11]。热激蛋白(HSP)的表达是由热激因子(HSF)调控的^[12],但在胁迫下的信号转导机制仍需进一步研究。研究表明,HSP 在植物应激反应中充当分子伴侣并发挥作用,HSP90 以共伴侣模式调控了木薯中水杨酸和生长素之间的拮抗作用。在枯萎病病菌诱导下 HSP90.9

通过促进水杨酸生物合成基因 *PBS3* 和色氨酸代谢基因 *ASMT2* 的转录激活促进了水杨酸的生物合成^[13]。植物中应对生物胁迫的适应性系统之一就是通过对 HSP 发挥作用,HSP 对生物胁迫的反应取决于致病生物和植物基因型^[14]。HSP17.8 和 WRKY 在抗性基因型的马铃薯中同时受到转录调控,HSP 使防御相关蛋白质在生物胁迫下保持活性^[15]。在细胞生物学中,HSP 在很长一段时间内被认为是一种蛋白质,在高温胁迫时产生。HSP 在植物生命周期中扮演着重要角色,除了参与生长发育外,还参与植物对逆境胁迫的响应,包括保护植物免受生物和非生物胁迫^[16]。

外源水杨酸能够通过诱导茶树的防御机制抵抗病原菌侵染,并且外源水杨酸能够诱导 HSP 基因的过表达,但茶树中水杨酸诱导的抗性机制尚不清晰。基于外源水杨酸对植物的重要作用,本研究拟对外源喷施水杨酸后不同时间点的茶树叶片基因进行转录组测序分析,得到各时间点上差异表达基因数量,筛选出在水杨酸处理的整个阶段都发生差异表达的基因,分析处理产生的信号通路差异以及 HSP 基因的表达差异。本研究将为外源水杨酸诱导的茶树抗病机制研究和茶树抗病分子育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品处理与采集

试验材料选用云南省农业科学院茶叶研究所试验基地 5 年生的感病品种云抗 10 号。于 2022 年 5 月 10 日开展试验,采用前期研究中确定的外源水杨酸浓度(1 mmol/L)喷施茶树叶片,9:00 喷施外源水杨酸,分别在第 1 d 15:00、第 1 d 21:00、第 2 d 9:00 和第 3 d 9:00 采集处理 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h 的

茶树芽下第4叶和第5叶片作为待测样品,液氮速冻后于-80℃保存。

1.2 cDNA 文库构建与注释

利用 RNA 提取试剂盒对叶片总 RNA 进行提取,然后反转录合成 cDNA,通过聚合酶进行链式反应扩增,进行凝胶电泳分离靶 DNA 片段,回收凝胶,完成 cDNA 文库构建。文库有效浓度大于 2 nmol/L,使用 Illumina HiSeq 平台进行测序,获得高质量非冗余的 clean reads,组装转录组数据,使用 BLAST 在 7 个数据库中对基因进行注释。

1.3 差异表达基因分析

使用 DESeq 方法进行差异表达基因分析,对基因表达量进行评估,产生的结果对 P 值(判定假设检验结果的参数)进行调整,控制错误率, P 值小于 0.05 并且差异倍数大于 2 的基因存在差异表达。

1.4 基因本体 (GO) 功能注释和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析

根据基因富集分析对差异表达基因进行分类,GO 注释通过 BLAST2 GO 程序完成,在差异表达基因中显著富集的 GO 功能条目通过 WEGO 生成 GO 分类图。利用 KEGG 分析生物进程,并将本研究数据与 KEGG 集成数据库数据进行比较分析。

1.5 构建蛋白质关联网络

使用分析工具 STRING (<https://cn.string-db.org/>) 构建蛋白质关联网络,分析蛋白质间的相互作用。

2 结果与分析

2.1 水杨酸诱导的转录组分析

为了探索水杨酸处理对茶树叶片内基因表达的调控作用,利用测序技术对未处理和水杨酸处理后 6 h、12 h、24 h、48 h 的茶树叶片进行转录组测序与分析。结果显示,在未处理和处理 6 h、12 h、24 h、48 h 的茶树叶片中分别得到大小为 41 887 894 bp、43 386 156 bp、45 284 300 bp、41 989 512 bp、42 918 618 bp 的序列,其中过滤得到的有效数据分别为 39 803 468 bp、41 580 120 bp、42 549 320 bp、39 857 074 bp、41 380 250 bp。原始数据的测序质量值在 20 以上的碱基比例 ($Q20$) 大于 97.00%,测序质量值在 30 以上的碱基比例 ($Q30$) 大于 93.00%,G+C 含量大于 44.00% (表 1)。

表 1 转录组测序数据质量评估

Table 1 Quality assessment of transcriptome sequencing data

样本	原始数据 (bp)	有效数据 (bp)	G+C 含量 (%)	$Q20$ (%)	$Q30$ (%)
SA 0 h	41 887 894	39 803 468	44.07	97.88	93.73
SA 6 h	43 386 156	41 580 120	44.53	97.97	94.02
SA 12 h	45 284 300	42 549 320	44.51	98.04	94.20
SA 24 h	41 989 512	39 857 074	44.68	98.03	94.08
SA 48 h	42 918 618	41 380 250	44.53	97.84	93.68

SA 0 h: 处理时间 0 h; SA 6 h: 处理时间 6 h; SA 12 h: 处理时间 12 h; SA 24 h: 处理时间 24 h; SA 48 h: 处理时间 48 h; $Q20$: 测序质量值在 20 以上的碱基比例; $Q30$: 测序质量值在 30 以上的碱基比例。

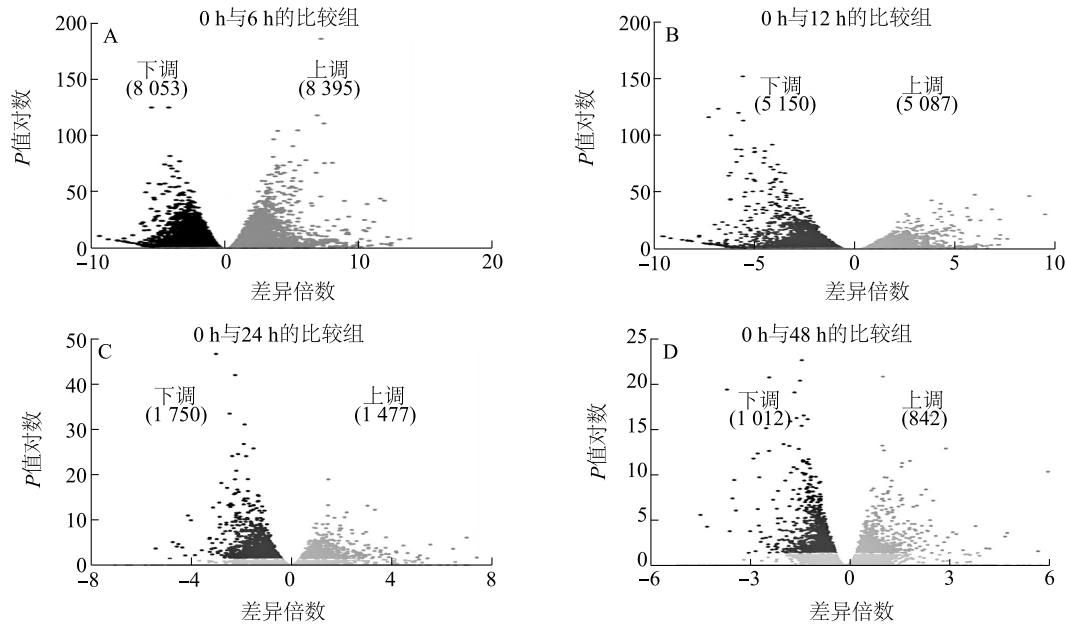
2.2 差异表达基因筛选

对注释的基因进行差异表达分析,筛选差异表达基因。结果(图 1)表明,外源水杨酸处理 0 h 与 6 h 间差异表达基因为 16 448 个,其中下调表达基因 8 053 个,上调表达基因 8 395 个;0 h 与 12 h 间差异表达基因为 10 237 个,其中下调表达基因 5 150 个,上调表达基因 5 087 个;0 h 与 24 h 间差异表达基因为 3 227 个,其中下调表达基因 1 750 个,上调表达基因 1 477 个;0 h 与 48 h 间差异表达基因为 1 854 个,其中下调表达基因 1 012 个,上调表达基因 842 个。差异表达基因数量逐渐减少,说明本研究设置的时间点中外源水杨酸喷施后 6 h 的诱导效果最为明显。

差异表达基因维恩图分析结果(图 2)显示,处理 6 h 时特有的差异表达基因有 9 360 个,处理 12 h 时特有的差异表达基因有 3 399 个,处理 24 h 时特有差异表达基因 596 个,处理 48 h 时特有差异表达基因为 115 个。表明在水杨酸处理的不同阶段茶树产生的差异性响应会随时间的变化而改变。在外源水杨酸处理 0~48 h 均发生差异表达的基因共有 604 个,这是保证外源水杨酸喷施后产生持续效果的关键。

2.3 差异表达基因 GO 功能富集分析

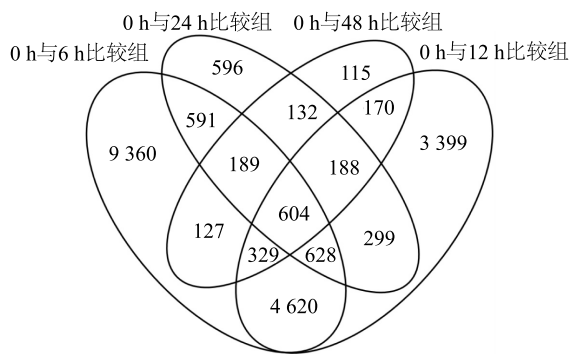
GO 功能富集结果(表 2)显示,大量差异表达功能基因数量随时间变化逐渐减少,如氧化代谢过程、有机酸代谢过程、应激反应、脂质代谢过程、细胞器合成、催化反应、膜蛋白质、转录调控活性、蛋白质活性、铁离子结合、ATP 酶活性,而部分差异表达功能基因数量在处理 12 h 后明显下降,如肽代谢过程、细胞酰胺代谢过程、翻译相关基因、多肽生物合成过程、细胞器膜相关、结构分子活性。处理 6 h 时差异表达基因主要富集于生物过程,富集于细胞酰胺代



A: 外源水杨酸处理 0 h 与 6 h 间的差异表达基因; B: 外源水杨酸处理 0 h 与 12 h 间的差异表达基因; C: 外源水杨酸处理 0 h 与 24 h 间的差异表达基因; D: 外源水杨酸处理 0 h 与 48 h 间的差异表达基因。P 值: 判定假设检验结果的参数。

图 1 差异表达基因火山图

Fig.1 Volcanic plot of differentially expressed genes



图中数据为差异表达基因的数量。

图 2 差异表达基因维恩图

Fig.2 Venn graph of differentially expressed genes

谢过程、有机酸代谢过程、肽代谢过程、应激反应和多肽生物合成过程的基因数分别为 247 个、220 个、191 个、143 个、186 个。富集于核糖体和细胞外围的细胞组成功能基因较多, 数量分别为 127 个、69 个。在分子功能方面, 处理 6 h 时富集于水解酶活性、转录调控活性、核糖核酸结合和脱氧核糖核酸结合转录因子活性的差异表达基因数量分别为 156 个、158 个、153 个、147 个。细胞酰胺代谢过程相关基因中 198 个基因上调表达, 49 个基因下调表达。

细胞碳水化合物代谢过程相关基因中 23 个基因上调表达, 66 个基因下调表达。铁离子结合相关基因中 72 个基因上调表达, 61 个基因下调表达。离子跨膜转运体相关基因中 69 个基因上调表达, 98 个基因下调表达。

2.4 差异表达基因 KEGG 富集分析

KEGG 富集分析结果(表 3)显示, 大部分信号通路相关的差异表达基因在处理 6 h 时富集数量最多, 随检测时间点增加差异表达基因富集数量逐渐减少。水杨酸处理 6 h 时有大量差异表达基因富集在植物激素信号转导、植物-病原菌互作、核糖体、剪接体和碳代谢通路上, 富集的基因数量分别为 95 个、73 个、121 个、94 个、154 个。另外, 富集在甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸的代谢通路、半胱氨酸和蛋氨酸代谢通路、氨基糖和核苷酸糖代谢通路的差异表达基因数量分别为 45 个、72 个、60 个。富集在糖酵解途径的差异表达基因数量为 63 个。核糖体相关通路共富集到差异表达基因 121 个, 其中 110 个上调表达, 下调表达数仅为 11 个。植物激素信号转导通路共富集到 95 个差异表达基因, 其中 58 个发生上调表达, 有 37 个下调表达。植物-病原菌互作通路共富集到差异表达基因

73 个,其中 51 个上调表达,22 个下调表达。这些结果表明外源水杨酸影响了茶树内的信号转导,推测在外源水杨酸喷施后茶树通过各信号通路的协同作用抵御病害侵染。

表 2 基因本体 (GO) 功能富集结果

Table 2 Gene ontology (GO) functional enrichment results

基因功能	差异表达基因数量 (个)			
	0 h 与 6 h 比较组	0 h 与 12 h 比较组	0 h 与 24 h 比较组	0 h 与 48 h 比较组
肽代谢过程	191	214	37	60
氧酸代谢过程	189	143	51	28
细胞酰胺代谢过程	247	221	38	60
小分子生物合成过程	123	86	25	21
翻译相关基因	179	209	35	59
多肽生物合成过程	186	211	36	59
有机酸代谢过程	220	143	51	28
应激反应	143	81	25	21
细胞碳水化合物代谢过程	89	53	29	19
脂质代谢过程	155	106	50	27
细胞器膜相关	171	192	36	58
核糖体	127	162	23	48
细胞器合成	126	76	17	12
细胞外围	69	48	14	8
染色体	18	11	11	8
光合系统	19	8	3	3
催化反应	71	35	6	3
膜蛋白质	85	46	10	4
细胞骨架	22	15	2	2
细胞壁	34	24	12	7
结构分子活性	145	168	24	49
转录调控活性	158	121	59	42
蛋白质活性	146	100	58	41
脱氧核糖核酸结合转录因子活性	147	115	58	41
水解酶活性	156	102	57	32
铁离子结合	133	93	34	31
氧化还原酶活性	111	93	41	30
离子跨膜转运体	167	86	26	9
腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP) 酶活性	113	69	36	26
核糖核酸结合	153	123	28	25

表 3 KEGG 富集结果

Table 3 KEGG enrichment results

通路	差异表达基因数量 (个)			
	0 h 与 6 h 的比较组	0 h 与 12 h 的比较组	0 h 与 24 h 的比较组	0 h 与 48 h 的比较组
甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸的代谢	45	32	21	13
植物激素信号转导	95	69	37	35
核糖体	121	151	76	73
剪接体	94	56	25	20
碳代谢	154	103	76	51
丙酮酸代谢	59	45	30	19
苯丙烷类物质生物合成	56	44	33	33
糖酵解途径	63	50	30	24
半胱氨酸和蛋氨酸代谢	72	45	44	29
信使核糖核酸监测通路	67	37	31	17
新陈代谢	59	32	13	13
氨基糖和核苷酸糖代谢	60	50	27	18
氨基酸的生物合成	129	93	67	43
嘌呤代谢	60	50	24	15
谷胱甘肽代谢	54	35	29	19
内质网中的蛋白质加工	106	71	41	33
RNA 降解	60	51	26	14
MAPK 信号通路-植物	54	47	23	17
RNA 转运	90	61	27	20
基础转录因子	22	13	5	2
内吞作用	67	39	21	33
氧化磷酸化	63	48	14	11
细胞自噬	22	11	3	3
植物-病原菌互作	73	60	31	22
氨酰生物合成	45	25	19	7
过氧化物酶体	42	28	30	15
泛素介导的蛋白质水解	53	42	19	15

2.5 差异表达基因中 HSP 相关基因

HSP 是高度保守的分子伴侣蛋白质,是植物通过调节热激蛋白应对胁迫形成的一种自适应系统。本研究结果显示,水杨酸喷施处理 6 h 时激活了 12 个热激因子 (HSF),包括 HSF8、HSF24、HSF30、HSFB1、HSFC1、HSFA1、HSFA2B、HSFA3、HSFA8、HSFB1、HSFB2A、HSFB2B。热激蛋白转录因子的激活能够调控热激蛋白基因的表达,结果显示,处理 6 h

时有 40 个热激蛋白基因发生差异表达,且全部上调表达,包括 10 个 *HSP70*、4 个 *HSP90*、1 个 *HSP15.7*、7 个 *HSP18.1*、4 个 *HSP18.2*、3 个 *HSP17.9*、2 个 *HSP20*、1 个 *HSP22*、1 个 *HSP23*、3 个 *HSP26*、3 个 *HSP82*、1 个 *HSP83* 家族基因。下调表达的热激蛋白基因仅有 *HSP26*。处理 12 h 时仍上调表达的热激因子有 3 个,32 个热激蛋白基因上调表达,与处理 6 h 相比上调表达的 *HSP70* 家族基因由 10 个下降为 5 个,*HSP90* 家族基因由 4 个下降为 3 个,*HSP18.1* 家族基因由 7 个下降为 6 个,*HSP18.2* 和 *HSP17.9* 上调表达的基因数量无变化(表 4)。处理 24 h 时上调表达的热激因子基因仅有 *HSFA1*。28 个热激蛋白基因上调表达,与处理 12 h 相比,*HSP70* 家族基因上调表达数量不变,*HSP90* 家族基因由 3 个变为 2 个,*HSP18.1* 家族基因由 6 个下降到 4 个,*HSP18.2* 家族基因由 4 个下降到 3 个,*HSP17.9* 家族基因上调表达数量不变。处理 48 h 时,无上调表达的热激因子基因,但仍有 28 个热激蛋白基因上调表达,与处理 24 h 相比,*HSP70* 家族基因,*HSP90* 家族基因,小热激蛋白 *HSP18.1*、*HSP18.2*、*HSP17.9* 家族基因上调表达数量无变化。

表 4 与热激蛋白基因(*HSP*)相关的部分差异表达基因

Table 4 Part of heat shock protein gene (*HSP*)-related differentially expressed genes

<i>HSP</i> 相关差异 表达基因	差异表达基因数量(个)			
	6 h 与 0 h 比较组	12 h 与 0 h 比较组	24 h 与 0 h 比较组	48 h 与 0 h 比较组
热激因子(<i>HSF</i>)	12	3	1	0
<i>HSP70</i> 家族	10	5	5	5
<i>HSP90</i> 家族	4	3	2	2
<i>HSP18.1</i> 家族	7	6	4	4
<i>HSP18.2</i> 家族	4	4	3	3
<i>HSP17.9</i> 家族	3	3	3	3

2.6 差异表达基因中胁迫相关基因

NPR 基因在植物免疫应答过程中发挥重要的作用,本研究结果显示,共有 3 个 *NPR* 基因在水杨酸喷施处理 6 h 的时间节点处上调表达,12 h 开始无 *NPR* 基因上调表达(表 5)。*BOPI* 基因在 4 个时间点显著上调表达,在外源水杨酸处理 6 h、12 h、24 h、48 h 时,上调表达倍数分别为 1.38 倍、1.53 倍、1.43 倍、1.24 倍。病程相关(*PR*)蛋白通常在胁迫环境下被诱导产生,本

研究中水杨酸诱导的 *PR* 蛋白基因在处理 48 h 时仍然上调表达。*WRKY* 家族转录因子在水杨酸通路中起着关键性的作用,结果显示,处理 6 h 和 12 h 时上调表达的 *WRKY* 家族转录因子基因均为 12 个,处理 24 h 时上调表达的 *WRKY* 家族转录因子基因 10 个,处理 48 h 时上调表达的 *WRKY* 家族转录因子基因减少到 9 个。激酶在植物体中参与众多的催化进程,激活或能化底物分子。本研究在处理 6 h 时诱导了 192 个激酶相关的基因,这一数量在处理后的 12 h 时从 192 个减少 120 个,在处理 24 h 时减少至 101 个,在处理 48 h 时诱导的激酶相关基因数量为 70。*MYB* 家族在植物应对逆境胁迫中起着重要作用,本研究结果显示,水杨酸喷施后 6 h 时 24 个 *MYB* 家族基因上调表达,在喷施后 12 h 时 19 个 *MYB* 家族基因上调表达,喷施后 24 h 时上调表达的基因数下降为 9 个,处理后 48 h 时上调表达基因为 8 个。*AP2* 家族广泛参与植物发育与胁迫应答等多种生物学进程,本研究结果显示,处理 6 h 时 19 个 *AP2* 家族基因上调表达,处理 12 h 时 12 个 *AP2* 家族基因上调表达,处理 24 h 时减少到 7 个,处理 48 h 时仍有 7 个 *AP2* 家族基因上调表达。*bZIP* 被认为参与多种生物学进程,包括花发育、光信号、病菌防御以及逆境胁迫响应。本研究结果显示,13 个 *bZIP* 家族基因在水杨酸喷施处理 6 h 时上调表达,12 h 后下降为 5 个,24 h 时仍有 5 个基因上调表达,48 h 时仅剩 3 个基因上调表达。这些差异表达基因将是外源水杨酸诱导茶树抗病机制的关键。

表 5 胁迫相关的部分差异表达基因

Table 5 Part of stress-related differentially expressed genes

胁迫相关差异 表达基因	差异表达基因数量(个)			
	6 h 与 0 h 比较组	12 h 与 0 h 比较组	24 h 与 0 h 比较组	48 h 与 0 h 比较组
<i>NPR</i> 家族	3	0	0	0
<i>WRKY</i> 家族	12	12	10	9
<i>MYB</i> 家族	24	19	9	8
<i>AP2</i> 家族	19	12	7	7
<i>bZIP</i> 家族	13	5	5	3
<i>PR</i> 家族	1	1	1	1

3 讨论

外源水杨酸与内源水杨酸一样,都能够诱导植物免疫反应。*NPR1* 是第一个被报道的水杨酸诱导植物

免疫反应必需的基因,分为3个大类,*NPR1*和*NPR2*为一类,*NPR3*和*NPR4*为一类,*BOP1*和*BOP2*为一类^[17]。*NPR*蛋白作为中枢调节水杨酸诱导的基因表达^[18],通过与其他激素调节途径的相互作用调节免疫和其他生物进程^[19]。*NPR1*和*NPR2*在水杨酸诱导反应的下游基因调控中起着积极的作用,而*NPR3*和*NPR4*起负调控作用^[3, 20]。*NPR1*、*NPR2*、*NPR3*和*NPR4*在体外试验中与水杨酸具有强相互作用,而*BOP1*和*BOP2*与水杨酸具有弱相互作用^[21]。本研究中*BOP1*基因在4个时间点显著上调表达,因此推测*BOP1*基因同样在茶树对外源水杨酸的响应中发挥作用。

*WRKY*转录因子基因在植物中调控各种发育过程和胁迫反应,并且参与水杨酸信号通路。在烟草中水杨酸能够提高*WRKY5*、*WRKY7*、*WRKY27*、*WRKY31*、*WRKY40*、*WRKY50*、*WRKY56*、*WRKY59*、*WRKY60*、*WRKY102*的表达水平,其中*WRKY40*的上调表达增强了烟草的抗性^[22]。在拟南芥中,水杨酸促进了*NPR1*与*WRKY18*的相互作用,促进了*NPR1*在植物防御机制中的表达^[23]。*WRKY19*的表达促进了拟南芥对根结线虫的基础免疫^[24]。本研究中水杨酸处理激活了*WRKY14*、*WRKY17*、*WRKY18*、*WRKY19*等12个*WRKY*家族转录因子基因上调表达,这可能是水杨酸诱导茶树免疫反应的关键。

研究结果表明,*HSP*基因参与植物的抗病,例如,*HSP90*基因上调表达能够提高番茄对番茄黄化曲叶病毒(TYLCV)的抗性^[25]。而在一些植物中*HSP*基因的应答并不一致,如病原真菌感染时水稻中*HSP*基因表现出不同的反应,其中*HSP16*、*HSP17*、*HSP18.1*和*HSP18.2*上调表达,*HSP16.6*、*HSP17.8*、*HSP18.8*和*HSP22*下调表达^[26]。*HSP*基因还能够调控真菌感染的严重程度,如番茄中尖孢镰刀菌的侵染与*HSP20*和*PR*蛋白有关^[27];*HSP17.6*的沉默造成黑根霉侵染^[28]。本研究中外源水杨酸喷施造成40个*HSP*基因上调表达,仅*HSP26*基因下调表达。蛋白质关联网络显示*HSP70*和*HSP89.1*在关联网络中处于核心位置,*HSP70*与*AP2*直接关联,并且与苯丙氨酸解氨酶(*PAL*)间接相关。*PAL*是用作衡量植物抗逆性的重要指标^[29],*HSP70*与*PAL*的关联性表明*HSP70*在植物抗逆性中扮演关键角色。目前,已知外源水杨酸能够诱导植物的免疫反应,而且水杨酸能够应用于茶饼病的防控^[30],但热激蛋白是否参与茶树的抗病机制仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] VLOT A C, DEMPSEY D A, KLESSIG D F. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease [J]. Annual Review of Phytopathology, 2009, 47: 177-206.
- [2] RIVAS-SAN VICENTE M, PLASENCIA J. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development [J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(10): 3321-3338.
- [3] DING Y L, SUN T J, AO K V, et al. Opposite roles of salicylic acid receptors *NPR1* and *NPR3/NPR4* in transcriptional regulation of plant immunity [J]. Cell, 2018, 173(6): 1454-1467.
- [4] WANG F J, TAN H F, HUANG L H, et al. Application of exogenous salicylic acid reduces Cd toxicity and Cd accumulation in rice [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 207: 111198.
- [5] NAGASHIMA Y, IWATA Y, ASHIDA M, et al. Exogenous salicylic acid activates two signaling arms of the unfolded protein response in *Arabidopsis* [J]. Plant and Cell Physiology, 2014, 55(10): 1772-1778.
- [6] FU Z Q, YAN S, SALEH A, et al. *NPR3* and *NPR4* are receptors for the immune signal salicylic acid in plants [J]. Nature, 2012, 486: 228-232.
- [7] SHI Y L, SHENG Y Y, CAI Z Y, et al. Involvement of salicylic acid in anthracnose infection in tea plants revealed by transcriptome profiling [J]. International Journal Molecular Sciences, 2019, 20(10): 2439.
- [8] 王云锋, 王春梅, 王长秘, 等. 外源水杨酸对稻瘟病菌效应蛋白BAS4过表达菌株耐受性的影响 [J]. 南方农业学报, 2017, 48(12): 2169-2175.
- [9] LI X F, RIAZ M, SONG B Q, et al. Exogenous salicylic acid alleviates fomesafen toxicity by improving photosynthetic characteristics and antioxidant defense system in sugar beet [J]. Ecotoxicology and Environment Safety, 2022, 238: 113587.
- [10] WASSIE M, ZHANG W, ZHANG Q, et al. Exogenous salicylic acid ameliorates heat stress-induced damages and improves growth and photosynthetic efficiency in alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. Ecotoxicology and Environment Safety, 2020, 191: 110206.
- [11] MAZZONI-PUTMAN S M, BRUMOS J, ZHAO C, et al. Auxin interactions with other hormones in plant development [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2021, 13(10): a039990.
- [12] ZHUANG L L, CAO W, WANG J, et al. Characterization and functional analysis of *fahsf1b* from *Festuca arundinacea* conferring heat tolerance in *Arabidopsis* [J]. International Journal Molecular Sciences, 2018, 19(9): 2702.
- [13] WEI Y X, ZHU B B, LIU W, et al. Heat shock protein 90 co-chaperone modules fine-tune the antagonistic interaction between salicylic acid and auxin biosynthesis in cassava [J]. Cell Reports, 2021, 34(5): 108717.
- [14] DODDS P N, RATHJEN J P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions [J]. Nature Reviews Genetics, 2010, 11: 539-548.
- [15] YOGENDRA K N, KUMAR A, SARKAR K, et al. Transcription fac-

- tor StWRKY1 regulates phenylpropanoid metabolites conferring late blight resistance in potato[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(22): 7377-7389.
- [16] UL HAQ S, KHAN A, ALI M, et al. Heat shock proteins: dynamic biomolecules to counter plant biotic and abiotic stresses[J]. *International Journal Molecular Sciences*, 2019, 20(21): 5321.
- [17] BACKER R, MAHOMED W, REEKSTING B J, et al. Phylogenetic and expression analysis of the *NPRI*-like gene family from *Persea americana* (Mill.) [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 29, 6: 300.
- [18] FU Z Q, DONG X. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2013, 64: 839-863.
- [19] VAN BUTSELAAR T, VAN DEN A G. Salicylic acid steers the growth-immunity tradeoff [J]. *Trends in Plant Science*, 2020, 25(6): 566-576.
- [20] CASTELLÓ M J, MEDINA-PUCHE L, LAMILLA J, et al. *NPRI* paralogs of *Arabidopsis* and their role in salicylic acid perception[J]. *PLoS One*, 2018, 13(12): e0209835.
- [21] MANOHAR M, TIAN M, MOREAU M, et al. Identification of multiple salicylic acid-binding proteins using two high throughput screens [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 5: 777.
- [22] WANG X, YAN Y, LI Y, et al. *GhWRKY40*, a multiple stress-responsive cotton *WRKY* gene, plays an important role in the wounding response and enhances susceptibility to *Ralstonia solanacearum* infection in transgenic *Nicotiana benthamiana* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e93577.
- [23] CHEN J, MOHAN R, ZHANG Y Q, et al. *NPRI* promotes its own and target gene expression in plant defense by recruiting *CDK8* [J]. *Plant Physiology*, 2019, 181(1): 289-304.
- [24] WARMERDAM S, STERKEN M G, SUKARTA O C A, et al. The *TIR-NB-LRR* pair *DSCI* and *WRKY19* contributes to basal immunity of *Arabidopsis* to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* [J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 73.
- [25] GOROVITS R, CZOSNEK H. The involvement of heat shock proteins in the establishment of tomato yellow leaf curl virus infection [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 355.
- [26] SARKAR N K, KIM Y K, GROVER A. Rice *sHsp* genes: genomic organization and expression profiling under stress and development [J]. *BMC Genomics*, 2009, 10: 393.
- [27] VAN O G, LUKASIK E, VAN DEN BURG HARROLD A, et al. The small heat shock protein 20 RSI2 interacts with and is required for stability and function of tomato resistance protein I-2 [J]. *The Plant Journal*, 2010, 63(4): 563-572.
- [28] PAN X, ZHU B, LUO Y, et al. Unraveling the protein network of tomato fruit in response to necrotrophic phytopathogenic *Rhizopus nigricans* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73034.
- [29] ZHANG H, HUANG Q, YI L, et al. PAL-mediated SA biosynthesis pathway contributes to nematode resistance in wheat [J]. *The Plant Journal*, 2021, 107(3): 698-712.
- [30] 冉隆珣, 肖 星, 殷丽琼, 等. 水杨酸和茉莉酸诱导茶树抗茶饼病研究初报 [J]. *陕西农业科学*, 2022, 68(4): 32-35.

(责任编辑:陈海霞)