茶叶学报 2024，65（1）：20−27
Acta Tea Sinica

DOI：10.20045/j.cnki.issn.2096-0220.2024.01.003
引文格式：郭珺珺，伊亮辉，肖清，等. 茶树 *WRKY19* 基因的克隆及其抗寒功能研究［J］. 茶叶学报，2024，65(1)：20−27.

茶树 *WRKY19* 基因的克隆及其抗寒功能研究

郭珺珺†，伊亮辉†，肖　清，夏恩华，童　伟*

（安徽农业大学茶树生物学与资源利用国家重点实验室，安徽　合肥　230036）

摘　要：【目的】茶树作为一种喜温畏寒植物，低温严重制约茶产业的发展。茶树 *WRKY19* 基因的克隆及抗寒功能研究为其抗逆工程育种提供重要理论依据。【方法】基于前期对茶树 WRKY 基因家族的鉴定，本研究筛选并克隆得到一个受低温诱导显著上调表达的 *WRKY* 转录因子，将其命名为 *CsWRKY19*。对 *CsWRKY19* 进行序列特征分析并结合基因表达抑制试验初步研究其在茶树抗寒中的功能。【结果】*CsWRKY19*基因 CDS 全长为 1 680 bp，编码 559 个氨基酸；包含 2 个典型的 WRKYGQK 保守基序；定量 PCR 分析表明 *CsWRKY19* 表达具有组织特异性，在根和幼嫩芽叶中高表达并受冷驯化诱导显著上调表达；经反义寡核苷酸抑制 *CsWRKY19* 表达后，茶树叶片在低温下的损伤程度显著加剧、丙二醛含量显著增加、超氧化物歧化酶活性降低，初步证明 *CsWRKY19* 在茶树应答低温胁迫中可能具有重要作用。【结论】本研究鉴定了一个茶树转录因子 *CsWRKY19*，并初步验证了其在茶树应对低温胁迫中的潜在功能。

关键词：茶树；*CsWRKY19*；低温胁迫；表达分析；功能研究

中图分类号：S571.1　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**2096−0220（2024）01−0020−08

Identification of *CsWRKY*19 Involving Cold Tolerance of Tea Plants

GUO Jun-jun†, YI Liang-hui†, XIAO Qing, XIA En-hua, TONG Wei*

(*State Key Laboratory of Tea Plant Biology and Utilization*, *Anhui Agricultural University*, *Hefei*, *Anhui* 230036, *China*)

Abstract:【Objective】*CsWRKY*19 in *Camellia sinensis* was cloned to study its relationship with the adaptation and survival of the normally cold sensitive plant exposed to low temperatures.【Method】Based upon previously identified *WRKY* family in tea plants, *CsWRKY*19 showing significant upregulation by low temperatures was screened and cloned. Sequence and expressions of the gene in different tissues under cold stress were determined. By suppressing the expression, the ability of a tea plant to tolerate low temperatures was examined for verification.【Result】*CsWRKY*19 had a full CDS of 1,680 bp encoding 559 amino acids and containing 2 typical WRKYGQK conserved motifs. The tissue-specific expression of the gene was relatively high in the buds, young leaves, and roots of a plant. Exposing the plant to low temperatures significantly upregulated the gene expression, and if the expression was suppressed at the same time, worse damage on the leaves resulted. Meanwhile, as the surrounding temperature was lowered, the malondialdehyde content rose significantly and the superoxide dismutase activity declined in the plant.【Conclusion】The transcription

收稿日期：2024−01−03 初稿；2024−02−20 修改稿
基金项目：安徽农业大学大学生创新创业训练计划项目（X202210364672）；安徽省高等学校科学研究项目（自然科学类）重点项目（2022AH050867）。
作者简介：郭珺珺（2002−），女，本科生，研究方向：茶叶品质形成与逆境调控。E-mail: Guojunjun200212@163.com
† 代表作者贡献相同
*** 通信作者：**童伟（1989−），男，博士，副教授，研究方向：茶叶品质形成与逆境调控。E-mail: wtong@ahau.edu.cn

factor of *WRKY*19 in tea plant was identified as *CsWRKY*19, which appeared to be significantly associated with the response of a tea plant to cold stress.

Key words: *Camellia sinensis*; *CsWRKY*19; cold stress; expression analysis; functional study

0　引言

【研究意义】茶树（*Camellia sinensis*）是一种喜温畏寒的多年生常绿木本植物，是我国乃至世界上重要的经济作物。作为一种叶用植物，茶树的生长状态直接影响到茶叶的产量和品质。低温和干旱等环境因素也会直接影响茶树的生长。近年来，随着茶叶需求量的增加，尽管茶树种植范围不断扩大，北移倾向明显，但一些南方优良种质在由低纬度茶区向高纬度茶区引种栽培时受温度制约，仍不能适应当地气候、越冬困难。加之近年来全球气候的多变，特别是“倒春寒”、霜冻和雪冻等自然灾害，造成了茶园大面积减产减收，经济损失巨大，限制了我国茶树的分布和推广，严重制约着我国茶产业的可持续发展。因此，挖掘应答茶树低温胁迫的关键基因，阐明茶树响应低温胁迫的分子机理及其遗传基础，进而通过分子设计育种提高茶树抗寒性是解决这一生产实际问题的根本方法。【前人研究进展】茶树在长期的进化中形成各种应答机制来适应和抵御逆境胁迫，并通过基因表达来体现应答反应。研究表明，低温首先伤害茶树的细胞膜系统，这种伤害与细胞内活性氧积累密切相关[1]。植物受低温胁迫也会产生大量自由基使膜脂过氧化，而膜脂过氧化分解的主要产物为丙二醛（Malondialdehyde，MAD）。因此 MAD 含量的高低是判断植物细胞膜损伤程度的重要指标，其含量会随着损伤程度加重而增加[2]。超氧化物歧化酶（Superoxide dismutase，SOD）是一种可以消除活性氧的抗氧化酶，酶活性与植物抗性能力密切相关，植物在低温胁迫下 SOD 活性会增加以消除活性氧的侵害[3]。植物对光能利用的能力受温度影响，低温会损伤原初反应 PS Ⅱ反应中心，利用叶绿素荧光技术测定 PS Ⅱ最大光化学效率（*Fv/Fm*）可以判断植物光合生理状况[4]。转录因子（Transcription factors，TFs）又叫反式作用因子，其与相应的顺式作用元件特异结合来激活或抑制靶基因转录，实现对靶基因的表达调控[5]。WRKY 是植物中最丰富的转录因子之一，广泛存在于高等植物界，因含有高度保守的 WRKYGQK 氨基酸序列而命名[6]。随着现代分子生物学和高通量测序技术的进步，大量的 WRKY 转录因子基因被逐渐发现，其功能和调控作用机理也得到鉴定和验证。大量研究表明，WRKY 转录因子积极参与了植物逆境响应等过程，如低温、干旱、高盐等非生物胁迫，在植物防御反应机制中具有重要作用[7]。WRKY 基因家族成员众多，拟南芥（*Arabidopsis*）[8]、水稻（*Oryza sativa*）[9] 中分别有 74 和 109 个 WRKY 基因家族成员。Zhao 等[10] 对茶树的 WRKY 基因家族进行了系统的鉴定分析，在茶树基因组中共鉴定得到 86 个 WRKY 转录因子基因，并依次命名为 *CsWRKY1* 至 *CsWRKY86*。【本研究切入点】相比于拟南芥、水稻等模式植物，茶树中只有少数 WRKY 基因的功能被验证，大多数 WRKY 基因的功能尚未被探明。本课题组前期研究结果表明[10]，*CsWRKY19* 与茶树冷胁迫调控有关。【拟解决的关键问题】以‘舒茶早’茶树品种为植物材料克隆得到 *CsWRKY19*，并以该基因为切入点，通过基因序列分析、基因沉默、基因表达分析初步研究其功能，揭示 *CsWRKY19* 具有调控茶树抗寒的功能，有助于丰富 WRKY 转录因子在茶树冷胁迫逆境下的分子调控机制，为通过分子育种培育茶树抗寒品种提供潜在的基因靶标。

1　材料和方法

1.1　材料与试剂

低温胁迫试验材料为一年生‘舒茶早’盆栽扦插苗，选取生长健壮、无病原菌侵染、长势一致的茶苗置于低温培养箱进行低温胁迫［昼夜温度 25/20℃ 室温适应 6 h（CK），10/4℃ 低温适应 6 h、7 d（CA1），4/0℃ 低温处理 7 d（CA2），光照强度为 6 000～10 000 lux，相对湿度为 70%］；选取合适样品于液氮中速冻，存于−80℃ 冰箱，备用；其余试验材料为多年生舒茶早茶树品种春梢，种植于安徽农业大学农萃园茶树品种园（北纬 31°86′，

东经 117°26′)。

仪器设备：PCR 仪（S1000，美国伯乐）；电泳仪（DYY-6D，北京六一仪器厂）；凝胶成像系统（Champ Gel 7000，北京赛智创业科技有限公司）；qRT-PCR 仪（CFX-96，美国伯乐）；叶绿素荧光成像仪（Imaging Pam，德国 WALZ）。

主要试剂：RNAprep Pure 植物总 RNA 提取试剂盒［天根生化科技（北京）有限公司］；TakaRa cDNA Synthesis Kit 体系（日本 TakaRa 公司）；大肠杆菌（Escherichia coli）感受态 Trans-T1 细胞（北京全式金生物技术有限公司）；Hieff qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒［翌圣生物科技（上海）股份有限公司］；MDA 含量检测试剂盒、SOD 活性检测试剂盒（北京索莱宝生物科技有限公司）。

1.2 基因克隆

总 RNA 的提取参照 RNAprep Pure 植物总 RNA 提取试剂盒进行。根据 TakaRa cDNA Synthesis Kit 体系，合成 cDNA，放于−20℃ 保存。*CsWRKY19* 参考序列源于舒茶早转录组数据库，基于该参考序列，使用 Primer Premier 6.0 设计序列全长引物（表 1），以提取的舒茶早 RNA 反转录得到的舒茶早 cDNA 为模板，对目的基因 *CsWRKY19* 进行 PCR 扩增。扩增总反应体系为 25 μL：Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase 0.5 μL、cDNA 1 μL、*WRKY19*-F 和 *WRKY19*-R 各 1 μL、dNTP 0.5 μL、5× buffer 12.5 μL、ddH_2O 8.5 μL。PCR 反应程序为：95℃ 预变性 3 min；95℃ 变性 10 s，60℃ 退火 15 s，72℃ 延伸 2 min，35 个循环；72℃ 彻底延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后，切胶回收目的片段，连接在 PGEX4-T-1 载体上，连接成功后将质粒转移到大肠杆菌（*Escherichia coli*）感受态 Trans-T1 细胞中。鉴定阳性克隆后，送至上海通用生物公司测序。利用网站 https://www.novopro.cn/tools/protein_iep.html 分析 *CsWRKY19* 蛋白的特征，对扩增出的 *CsWRKY19* 基因进行序列分析。

1.3 实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）

根据克隆得到的 *WRKY19* 基因的全长序列，设计 *CsWRKY19* 的定量引物 *CsWRKY19*-qF 和 *CsWRKY19*-qR。采用 SYBR Green Ⅰ染料法，以茶树 *CsACTIN* 作为内参基因。参考 Hieff qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒对 *CsWRKY19* 基因的表达量进行实时荧光定量 PCR 分析，反应体系为：Hieff qPCR SYBR Green Master Mix 10 μL；*CsWRKY19* 基因上下游引物各 0.6 μL；cDNA 1 μL；补 ddH_2O 至 20 μL。qRT-PCR 扩增程序：95℃ 预变性 10 min；95℃ 15 s，60℃ 30 s，72℃ 30 s，40 个循环。设置 3 个生物学重复和 3 个技术性重复，运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析实验数据。

1.4 反义寡核苷酸抑制

1.4.1 反义寡核苷酸的引物设计与合成

茶树 *CsWRKY19* 基因的沉默采用反义寡核苷酸（antisense oligonucleotide，ASON）技术。在

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列 5'-3' Primer sequences	用途 Application
CsWRKY19-F	ATGGCTTCTTCTTCAGAAATCACAAC	Cloning
CsWRKY19-R	TCATCGTAGGTACGAGTCGATGAAGG	
q*CsWRKY19*-F	GAGAGCAGAGAAGATCAGAAGATGG	qRT-PCR
q*CsWRKY19*-R	TGGAGTGTTGAATTGGTTGAGAAGA	
q*CsACTIN*-F	GCCATCTTTGATTGGAATGG	
q*CsACTIN*-R	GGTGCCACAACCTTGATCTT	
AsODN	AAGGGTAGTCTTCGGCGAGGAG	Silencing of *CsWRKY19*
	GAAGGGTAGTCTTCGGCGAGGA	
	CGGTTCTCTCGGTTATTCTATC	
	ACCGGTTCTCTCGGTTATTCTA	

sfold 网站（http://sfold.wadsworth.org/cgi-bin/soligo.pl）根据 *CsWRKY19* 克隆序列设计 *CsWRKY19* 基因的反义寡核苷酸的引物，并通过 BioEdit 软件与茶树基因组数据库（http:tpia.teaplant.org/index.html）比对，筛选出与茶树 *CsWRKY19* 基因特异性反义寡聚核苷酸引物序列，送至上海通用生物公司合成引物。

1.4.2　基因表达抑制及低温处理

将合成的两条引物经灭菌水稀释后混合，使其最终浓度为 20 μM·L^{-1}。选取大小基本一致、色泽健康、无虫无病的一芽二叶，插入装有 1 ml 20 μM·L^{-1} 引物溶液 1.5 mL 离心管中，确保一芽二叶尾部没入溶液，用透气性封口膜密封离心管口，防止引物挥发，以免造成试验误差。将离心管放入 25℃ 光照培养箱中按光照 16 h/黑暗 8 h 进行光照培养，取样的时间分别设定在 0、6、12、24 和 36 h。灭菌水为对照组，每组每一时间各设置 15 个重复。沉默后所得实验样品重复用液氮进行固样，根据各时间点收集的样品，对其提取 RNA 并进行实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）分析，检测茶树 *CsWRKY19* 基因在各个时间段的表达量。以 ACTIN 基因为内参基因，茶树 *CsWRKY19* 基因的相对表达量通过实时荧光定量 PCR 仪所测定的 ct 值（采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法）计算分析，最终确定抑制效果最佳的处理时间。

根据上述试验所确定的沉默最佳时间点，对条件相似的茶苗一芽二叶进行沉默处理。以灭菌水为对照，每组各设置 15 个重复。沉默处理后的茶苗一芽二叶，在 0℃ 低温下处理 1 h。试验组和对照组各取 6 个重复于室温 25℃ 条件下暗恢复处理 30 min，以平静反应中心，恢复后采用叶绿素荧光成像仪进行荧光成像，对比抗寒性差异。余下茶苗不经黑暗恢复，直接用液氮进行固样，放入−80℃ 超低温冰箱中保存，用于下一步生理生化指标的检验。

1.5　抗寒生理指标测定

取−80℃ 保存经沉默处理的叶片，对其进行生理生化指标测定。本试验测定了茶叶中 MDA 含量和 SOD 活性，具体操作方法参照试剂盒说明书。

1.6　数据统计与分析

采用 Excel 2019 和 Origin 2022 等软件进行数据处理分析。

2　结果与分析

2.1　*CsWRKY19* 的克隆与序列特征分析

以安徽农业大学农萃园内茶树品种舒茶早为材料提取的 RNA 反转录得到的舒茶早 cDNA 为模板，利用 PCR 技术扩增出 *CsWRKY19* 基因（图 1A），对其进行序列分析，结果发现 *CsWRKY19* 基因 CDS 全长 1 680 bp，共编码 559 个氨基酸残基，含有两个 WRKY 成员中保守的 WRKYGQK 氨基酸序列（图 1B），为第一类 WRKY 转录因子（Group Ⅰ），其分子质量为 62.13 kDa，等电点为 9.27，总平均亲水性为−0.894。此外，本研究克隆了 *CsWRKY19* 上游 2500 bp 的启动子序列，并通过 PlantCARE（a database of plant promoters and their cis-acting regulatory elements）网站分析了 *CsWRKY19* 的启动子序列。结果发现，*CsWRKY19* 上游 2500 bp 的启动子序列中包含了 ABRE（非生物胁迫响应元件）、G-box（光响应元件）、MYB 及 W-box 等诸多功能元件（图 1C）。

进一步使用 MEGA 软件，将茶树 *CsWRKY19* 与拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）、烟草（*Nicotiana attenuata*）、黄瓜（*Cucumis sativus*）、大豆（*Glycine max*）、非洲稻（*Oryza glaberrima*）、面包小麦（*Triticum aestivum*）的氨基酸序列进行系统进化关系分析，结果发现 *CsWRKY19* 基因编码的蛋白与其他物种 *WRKY19* 编码的蛋白同源性较高，*CsWRKY19* 具有两个典型的保守 WRKY 结构域（图 2），证明其编码的蛋白属于 WRKY 蛋白。

2.2　*CsWRKY19* 基因表达模式分析

使用 qRT-PCR 对 *CsWRKY19* 在茶树不同组织中的表达量进行分析。如图 3 所示，该基因在茶树的根、茎、嫩叶、成熟叶、老叶、花和芽中均有表达，但其表达具有明显的组织特异性。以茶树嫩叶中 *CsWRKY19* 的表达量为参照进行分析，发现花和芽中的 *CsWRKY19* 的表达量与嫩叶中相当；茎中 *CsWRKY19* 的表达量仅为嫩叶中的 9.1%，差异显著；*CsWRKY19* 在根中的表达量显著高于其他组织部位，表达量约为嫩叶中的 2.05 倍；并且在不同成熟度的叶片中，*CsWRKY19* 的表达量也有

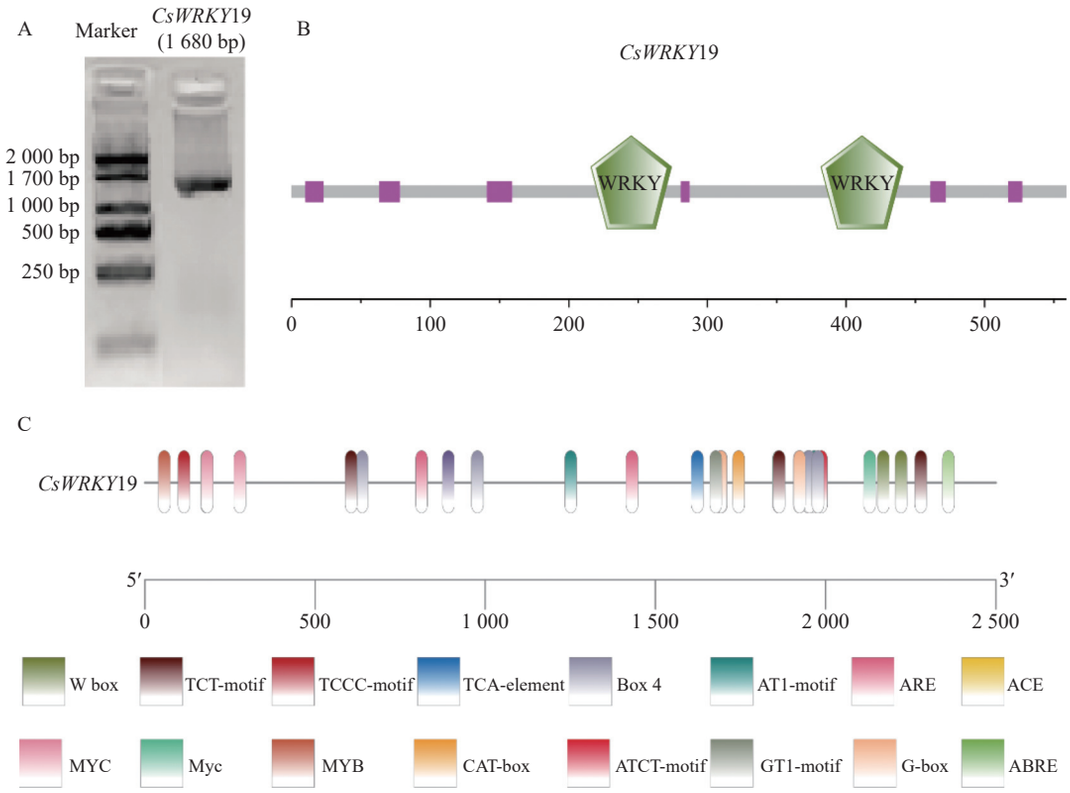

图 1　*CsWRKY19* 基因克隆、结构域和启动子分析

Fig. 1　Cloning, promoter, and domain of *CsWRKY*19

注：A: *CsWRKY19* 克隆的电泳胶图, M: DNA marker (DL2000)；B: *CsWRKY19* 编码的蛋白结构域分析；C：*CsWRKY19* 的启动子序列分析。GT1-motif、G-box、Box 4 和 AT1-motif 为光响应元件；ABRE 为非生物胁迫响应元件；其他元件功能未知。

Note: A: Gel image of *CsWRKY19*. B: Domain analysis of *CsWRKY19*. C: Promoter analysis of *CsWRKY19*. GT1-motif, G-box, Box 4 and AT1-motif are light-responsive elements. ABRE is an abiotic stress response element，Other component functions unknown.

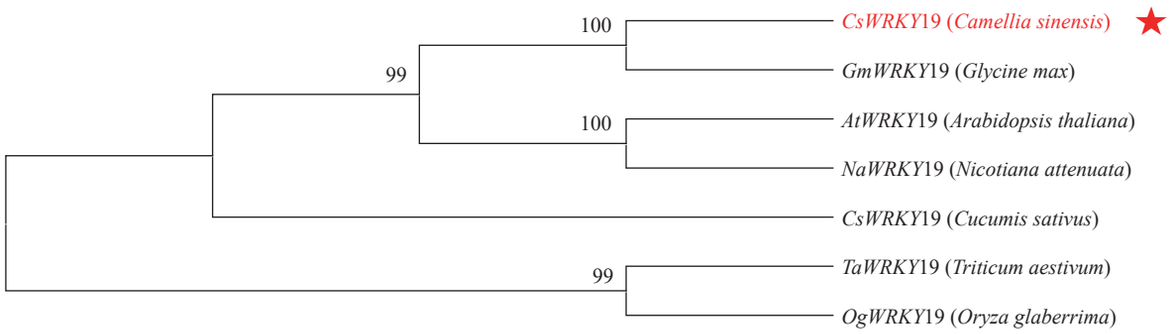

图 2　*CsWRKY19* 与 6 个物种的系统进化关系分析

Fig. 2　Phylogenetic tree of *WRKY*19 in 7 tea species

注：进化树分支中的数字代表自展值。茶树（*Camellia sinensis*）、拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）、烟草（*Nicotiana attenuata*）、黄瓜（*Cucumis sativus*）、大豆（*Glycine max*）、非洲大米（*Oryza glaberrima*）、面包小麦（*Triticum aestivum*）。

Note: The values beside the branch indicate the bootstrap values. Tea plant (*Camellia sinensis*), Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), tobacco (*Nicotiana attenuata*), Cucumber (*Cucumis sativus*), Soybean (*Glycine max*), African rice (*Oryza glaberrima*), Bread wheat (*Triticum aestivum*).

显著差异，其在成熟叶片中的表达量为嫩叶中的 31.8%，在老叶中的表达量为嫩叶中的 18.2%。上述结果表明，*CsWRKY19* 在根部表达量最高，其次为芽、嫩叶和花，在茎中表达量最低，在叶片中的表达量随叶片成熟度的增加而降低（图 3A）。

进一步通过 qRT-PCR 分析了 *CsWRKY19* 在低温胁迫下的表达模式，结果发现茶树经昼夜温度 10/4℃ 低温处理 6 h（CA1-6h 组）后，*CsWRKY19*

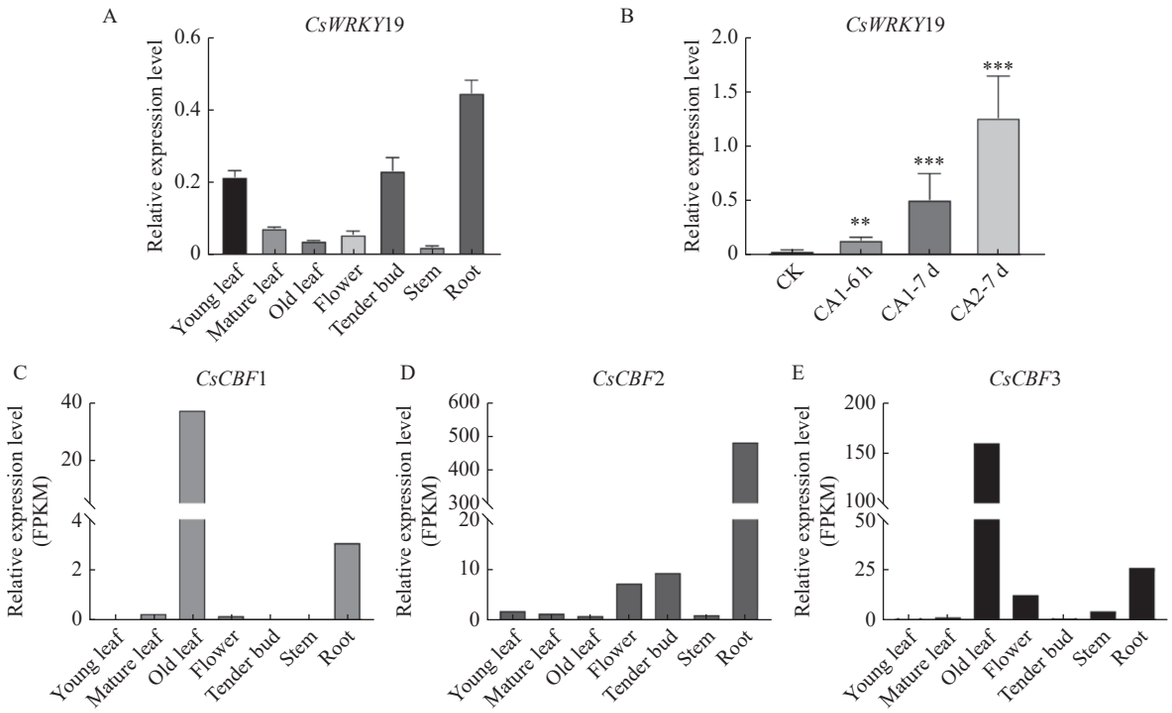

图 3　*CsWRKY19* 在不同组织和低温胁迫下的表达模式分析

Fig. 3　Expressions of *CsWRKY*19 in tissues of tea plant under cold stress

注：A 为 *CsWRKY19* 基因在茶树不同组织中的表达水平；B 为 *CsWRKY19* 在不同低温处理的相对表达量；C-E 为 *CsCBF1/2/3* 的组织表达模式。误差条上方的星号（*）表示经 t 检验差异显著（*，P≤0.05；**，P≤0.01；***，P≤0.001）；下同。

Note: A: The expression level of *CsWRKY19* gene in different tissues of tea plant; B: Relative expression of *CsWRKY19* in different low temperature treatments; C-E: The different organs expression pattern of *CsCBF1/2/3*. Asterisks above the error bar indicate significant differences by t-test (*, P ≤ 0.05; **, P ≤ 0.01; ***, P ≤ 0.001). Same for below.

基因的表达量为对照组的 4.21 倍；在该低温下持续处理 7 d（CA1-7d 组）后，茶树 *CsWRKY19* 基因的表达量相对于 CA1-6h 组有了显著提高，为 6 h 组的 3.6 倍；经昼夜温度 4/0℃ 处理 7 d（CA2-7d 组）后，该基因的表达量与 CK 组和 CA1-6h 组存在极显著性差异，相对于 CA1-7d 组有显著提升，分别为 CK、CA1-6h 和 CA1-7d 的 39.32、9.34 以及 2.6 倍（图 3B）。这些结果表明，低温胁迫显著诱导了 *CsWRKY19* 基因的表达，推测其可能参与了茶树的低温应答。

此外，基于舒茶早组织表达转录组数据库，本研究分析了茶树抗寒关键基因 *CsCBFs* 的不同组织表达模式。结果发现，*CsCBF1* 和 *CsCBF3* 在老叶中表达水平最高，其次为根，在其他组织中不表达或表达水平相对较低（图 3C、E）。*CsCBF2* 则在不同组织中呈组成性表达，其中在根中表达水平最高，其次为芽和花，在老叶和茎中表达水平最低（图 3D）；与 *CsWRKY19* 的组织表达模式具有一定的相似性。这些结果暗示着，*CsWRKY19* 可能通过介导 CBF 途径参与茶树的抗寒调控。

2.3　体内抑制 *CsWRKY19* 表达显著降低了茶树低温耐受性

为了初步验证 *CsWRKY19* 在茶树体内的抗寒功能，进一步利用反义寡核苷酸抑制技术在茶树体内抑制了 *CsWRKY19* 的表达以验证 *CsWRKY19* 的表达水平降低对茶树抗寒性的影响。通过反义寡核苷酸抑制表达后发现，茶树 *CsWRKY19* 基因的表达水平在抑制处理 12 h 时即呈现出较好的抑制效果，其表达抑制率达到了 50.10%（图 4A）。然后利用该时间点抑制的样品进行了低温处理实验，结果发现，*CsWRKY19* 表达受到抑制后的茶苗新梢在低温胁迫下的损伤程度显著高于对照组（图 4B）。通过检测 *Fv/Fm* 值（PS Ⅱ 的原初光能转化学效率），结果发现，经低温胁迫后，从 *CsWRKY19* 表达受到抑制的茶苗新梢检测到的 Fv/Fm 值显著低于对照组（图 4C）。这些结果表

明 *CsWRKY19* 基因对提高茶树抗寒性起积极作用。

MDA 是脂质过氧化的主要代谢产物，MDA 含量过多会使茶树细胞膜通透性增加，导致细胞膜结构、功能和代谢发生改变，严重损坏茶树细胞。因此，本研究检测了对应的 MDA 含量，结果发现，*CsWRKY19* 表达抑制的茶苗新梢其低温处理后的 MDA 含量显著高于对照组（图 4D）。另外，SOD 能有效清除植物体内过多的自由基，起到抗氧化作用，其活性高低可反应植物受外界不利环境影响的程度。试验发现，经 *CsWRKY19* 基因表达抑制后茶苗新梢内 SOD 的活性相比于对照组显著降低（图 4E）。综上所述，*CsWRKY19* 基因表达抑制后，显著降低了茶树的抗寒性，表明 *CsWRKY19* 正向调控茶树的抗寒性。

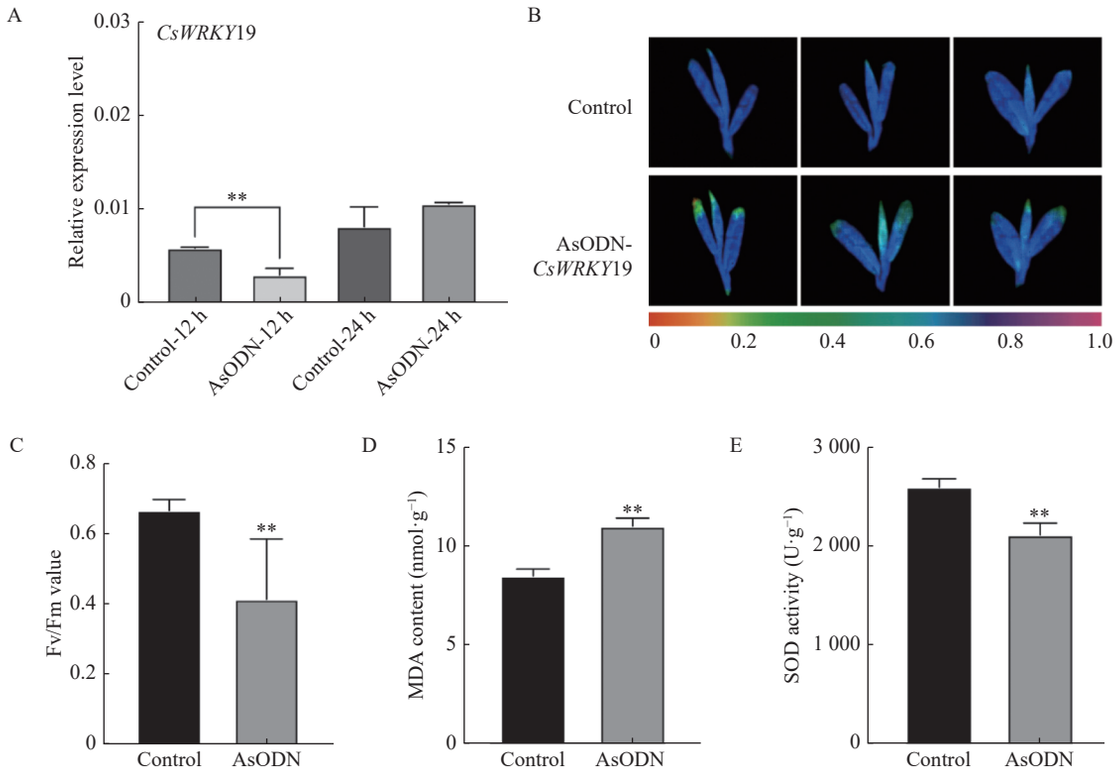

图 4　基因 *CsWRKY19* 表达抑制试验及其抗寒性检测

Fig. 4　Expression inhibition experiment of gene *CsWRKY19* and examination of the cold tolerance of tea plants

注：A 为 *CsWRKY19* 沉默后的表达水平；B 为 *CsWRKY19* 沉默后叶片受损程度；C-E 分别为 *CsWRKY19* 表达抑制样品的 Fv/Fm、MDA 含量、SOD 活性变化。

Note: A: Expression level of *CsWRKY19* after silencing; B: The degree of leaf damage after *CsWRKY19* silencing; C-E: The expression of CsWRKY19 inhibited the changes of Fv/FM, MDA content and SOD activity.

3　讨论与结论

我国茶树种植面积大、分布广，为应对极端天气对茶树生长生产的不良影响，培育抗逆性品种是茶树育种的重要发展方向[11]。低温是造成茶园减产、茶叶品质下降的重要原因之一，茶树抗寒性强弱与其自身抗寒基因密切相关。鉴定抗寒基因及其功能对茶树抗寒分子机制研究有重要意义。

WRKY 转录因子在植物生长发育、防御抵抗和逆境应答中发挥重要的调控作用，大量研究表明，不同 WRKY 的组织表达具有特异性，且 WRKY 可能在植物以及茶树应对低温胁迫过程扮演重要作用[12-14]。茶树基因组数据的公布，为科研人员从分子水平解析茶树 WRKY 转录因子的功能奠定了数据基础。利用生物信息学以及分子生物学对茶树 WRKY 转录因子进行分析验证，揭示茶树 WRKY 转录因子在茶树低温胁迫响应中的作用，为茶树的抗逆工程育种提供理论依据。课题组前期 Zhao 等[10] 对茶树中的 WRKY 基因家族进行了系统鉴定，并发现 *CsWRKY19* 与茶树冷胁迫响应有关。基于此，本研究克隆了茶树中的一个 WRKY

转录因子基因 *CsWRKY19*，通过 qRT-PCR 分析发现 *CsWRKY19* 在低温条件下的表达水平被显著诱导上调，表明其响应了茶树的低温胁迫。在不同组织表达模式上，发现 *CsWRKY19*与 *CsCBF2* 的组织表达模式具有一定的相似性，表明 *CsWRKY19* 调控茶树抗寒可能介导了 CBF 途径，但具体的分子机制有待进一步研究。为验证 *CsWRKY19* 的抗寒功能，本研究对 *CsWRKY19* 进行基因表达抑制实验，结果发现 *CsWRKY19* 表达受抑制的茶苗叶片在低温胁迫下受损程度更加严重、丙二醛含量更高、超氧化物歧化酶活性更低，说明 *CsWRKY19* 基因沉默显著降低了茶树的低温耐受性。这些结果初步表明茶树 *CsWRKY19* 基因可正调控茶树的抗寒性。在前期研究中，Wang 等[14] 发现 *CsWRKY2* 可以通过 ABA 途径参与茶树的低温和干旱胁迫。Peng 等[15] 分析了茶树 *CsWRKY4*在低温响应中的作用，表明 *CsWRKY4* 可以和 *CsOCP3* 与 *CsICE1* 相互作用并通过调控 *CsCBF1/3* 从而介导茶树的应激反应。这些研究使得科研工作者对 WRKY 转录因子参与茶树低温应答机制方面有了更多认识，然而，*CsWRKY19* 参与调控茶树低温耐受性的分子机制是怎样的？例如 *CsWRKY19* 是否会参与经典的 CBF 途径或者通过其他非 CBF 依赖途径进而参与茶树抗寒，其调控茶树低温应答的分子机制仍有待深入研究。

参考文献

[1] 时慧，王玉，周克福，等. 低温胁迫下茶树叶片活性氧代谢及渗透调节物质含量的变化规律[J]. 山东农业科学，2012，44(7)：22−25.

[2] 张玉翠，王连翠. 低温对茶树叶片膜透性和保护酶活性的影响[J]. 北方园艺，2010(9)：38−40.

[3] 黄建安. 茶树保护性酶类与抗寒性的关系[J]. 茶叶科学，1990(1)：35−40.

[4] 李庆会，徐辉，周琳，等. 低温胁迫对2个茶树品种叶片叶绿素荧光特性的影响[J]. 植物资源与环境学报，2015，24(2)：26−31.

[5] LEETONG I, YOUNG R A. Transcription of eukaryotic protein-coding genes[J]. Annual Review of Genetics, 2000, 34 (1): 77−137.

[6] 李蕾，谢丙炎，戴小枫，等. WRKY转录因子及其在植物防御反应中的作用[J]. 分子植物育种，2005(3)：401−408.

[7] 伍林涛，杜才富，张敏琴，等. WRKY转录因子的结构及其在植物抗逆境胁迫中的功能[J]. 分子植物育种，2013，11(4)：634−638.

[8] KALDE M, BARTH M, SOMSSICH I E, *et al*. Members of the Arabidopsis WRKY group Ⅲ transcription factors are part of different plant defense signaling pathways[J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 2003, 16 (4): 295−305.

[9] ROSS C A, LIU Y, SHEN Q J. The WRKY gene family in rice (*Oryza sativa*)[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2010, 49 (6): 827−842.

[10] ZHAO H, MALLANO AI, LI F, *et al*. Characterization of CsWRKY29 and CsWRKY37 transcription factors and their functional roles in cold tolerance of tea plant[J]. Beverage Plant Research., 2022, 2 (1): 116−128.

[11] 段慧，吴亮宇. 茶树抗逆性育种研究进展[J]. 福建茶叶，2007(1)：4−6.

[12] RUSHTON P J, SOMSSICH I E, RINGLER P, *et al*. WRKY transcription factors[J]. Trends in plant science, 2010, 15 (5): 247−258.

[13] LI P L, SON, A P, GAO C Y, *et al*. The over-expression of a chrysanthemum WRKY transcription factor enhances aphid resistance[J]. Plant Physiology & Biochemistry, 2015, 95: 26−34.

[14] WANG Y, SHU Z, WANG W, *et al*. *CsWRKY2*, a novel *WRKY* gene from *Camellia sinensis*, is involved in cold and drought stress responses[J]. Biologia Plantarum, 2016, 60: 443−451.

[15] PENG J, LI N, DI T, *et al*. The interaction of CsWRKY4 and CsOCP3 with CsICE1 regulates CsCBF1/3 and mediates stress response in tea plant (*Camellia sinensis*)[J]. Environmental and Experimental Botany, 2022, 199: 104892.