

柠檬醛诱导的拟南芥抗旱性及差异表达基因分析

张明迪, 白九元, 王鑫, 罗梅, 赵云, 张年辉
(四川大学生命科学学院生物资源与环境教育部重点实验室, 成都 610065)

摘要: 本研究旨在探讨柠檬醛在植物抗旱方面的潜在应用价值. 以不同浓度的柠檬醛处理拟南芥, 我们发现 200 $\mu\text{mol/L}$ 柠檬醛处理的拟南芥在随后干旱胁迫下的存活率高达 80%, 而未经柠檬醛处理的对照组只有 40% 左右. 转录组测序(RNA-seq)分析发现经 200 $\mu\text{mol/L}$ 柠檬醛处理后有 230 个差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs), DEGs 在 GO 功能注释和 KEGG 通路中分别显著富集为应激反应和内质网中的蛋白质加工, 且上调表达的 DEGs 许多都与热激蛋白家族相关. 从中挑选 4 个(AT1G07400, AT2G26150, AT4G25200, AT4G12400)进行 RT-qPCR 验证, 发现其反映的表达水平和 RNA-seq 数据一致. 本研究表明 200 $\mu\text{mol/L}$ 柠檬醛处理可以诱导拟南芥产生抗旱性, 并可能通过热激蛋白使干旱胁迫后部分解折叠的功能蛋白恢复生理活性状态, 从而使拟南芥显示出对干旱更强的耐受性和抵抗力.

关键词: 柠檬醛; 诱导抗性; 干旱胁迫; 差异表达基因

中图分类号: Q37 **文献标识码:** A **DOI:** 10.19907/j.0490-6756.2022.016001

Citral-induced drought resistance in *Arabidopsis thaliana* and analysis of differentially expressed genes

ZHANG Ming-Di, BAI Jiu-Yuan, WANG Xin, LUO Mei, ZHAO Yun, ZHANG Nian-Hui
(Key Laboratory of Bio-Resource and Eco-Environment of Ministry of Education,
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: This study aims to explore the potential application value of citral in the drought resistance of plants. Different concentrations of citral were used to treat *Arabidopsis thaliana* seedlings, and it was found that the survival rate of *Arabidopsis thaliana* treated with 200 $\mu\text{mol/L}$ citral under subsequent drought stress was up to 80%, while that of the control group without citral treatment was only about 40%. The results of transcriptome sequencing (RNA-seq) showed that there were 230 differentially expressed genes (DEGs) between seedlings treated with and without 200 $\mu\text{mol/L}$ citral. DEGs were significantly enriched in the response to stimulus and protein processing in endoplasmic reticulum, respectively, in GO term and KEGG pathway, and most of 129 up-regulated genes were related to the heat shock proteins. Four of them (AT1G07400, AT2G26150, AT4G25200, AT4G12400) were selected for RT-qPCR verification, and the gene expression level reflected by RT-qPCR was consistent with the RNA-seq data. The results of this study indicated that the drought resistance was obtained in *Arabidopsis thaliana* seedlings treated with 200 $\mu\text{mol/L}$ citral, which may be realized by heat shock proteins to restore

收稿日期: 2021-03-18
基金项目: 国家自然科学基金(31071334)
作者简介: 张明迪(1995—), 女, 河南郑州人, 硕士研究生, 主要研究领域为植物遗传与分子生物学. E-mail: 1016278625@qq.com
通讯作者: 张年辉. E-mail: zhangnianhui@scu.edu.cn

the physiologically active state of functional proteins that partially unfolded under subsequent drought stress conditions, thereby acquiring better tolerance and resistance to drought stress.

Keywords: Citral; Induced resistance; Drought stress; Differentially expressed genes

1 引言

植物营固着生长,当外界环境中出现不利因素时无法通过逃逸趋利避害,而各种生物和非生物胁迫都会对植物的正常生长造成伤害.其中干旱胁迫是制约植物生长最严重的胁迫之一,对植物可造成多方面的伤害,包括种子萌发和早期营养生长、气孔开度和光合作用、水分关系、种子品质和植株产量等^[1].受水资源短缺和气候变化的影响,预计干旱在全球范围内发生的频率和范围还会有进一步增加和扩大的趋势.据统计数据显示,我国西北地区的农业干旱灾害面积由 20 世纪 50 年代的 64.1 万公顷增加到 21 世纪的 330.2 万公顷^[1](1 万公顷=100 km²),这严重威胁农业生产和粮食安全.目前也有一些技术和方法用以预防或者缓解干旱:(1)在农业生产上倡导节水农业.如采用滴灌、“赤字”灌溉等代替传统的漫灌以优化灌溉方式提高水资源利用效率;如通过监测植物的表型、光合速率、蒸腾速率和水分利用效率等判断植物体内水分状态为确定植物供水时间提供精准有效的参考等.(2)通过选育耐旱抗旱品种以从根本上改善植物在干旱环境中的适应性.如利用杂种优势将具有目标性状的遗传群体持续进行杂交组合直至选育出目标品种的传统育种策略;或基于转基因技术将在干旱中起正调控作用的基因过表达或者敲除沉默起负调控作用的基因从而获得耐旱抗旱新品种的现代育种策略^[2-4].但无论是节水农业的推进还是新品种的选育,尽管已经并且还将不断取得进展和突破,然而当真正应用于生产实践时仍存在着投资成本过高,研究成果难以转化为实际成果和效益等弊端,干旱胁迫依旧是农业生产中要面临的严峻挑战.

化感作用是自然界中广泛存在的一种生物化学调控机制,是一个生物体自身产生的化合物(化感物质)对另一生物体产生的积极或者消极影响^[5].植物化感作用常被用于农田杂草的防治.高粱被认为是具有强烈化感作用的植物之一,其水浸提物对于抑制农田杂草的生长十分有效^[6].化感作用也可应用于防治植物病虫害^[7].近年来,一些研究者还评估了化感作用在促进植物生长、提高作物

抗非生物胁迫方面的潜力^[8].例如 Munir^[9]把 5%~10%的高粱浸提物作为外源物质施加到小麦植株上显著改善了小麦在热胁迫下的适应性.基于化感物质大多源于植物产生的次级代谢产物,通常价格低廉且简单易得,相较于推进节水农业和选育耐旱抗旱新品种,利用化感作用提高植物的抗旱性具有投资少见效快的特点,同时相对简单的喷洒处理方式在应用时具有更强的实用性和可操作性.

柠檬醛(3,7-二甲基-2,6-辛二烯,C₁₀H₁₆O)是一种无环开链单萜稀醛类天然活性物质,分子量为 152.23,广泛存在于多种植物中,尤其是具有挥发性香味的芳香植物,如柠檬草、樟树和山苍子等^[10].柠檬醛的化感作用已经有过一些研究:如 Graña 等^[11]的研究发现柠檬醛对农作物和杂草具有毒害效应,并且对杂草的抑制效果远高于农作物;柠檬醛可以改变拟南芥根和芽中生长素与乙烯的含量以抑制根的生长^[12];柠檬醛会对拟南芥开花和种子形成产生一定的伤害^[13].另外,Chaimovitch 等^[14]发现柠檬醛处理可导致小麦根细胞中新形成的细胞壁畸形,同时也影响细胞分裂时期微管的正常形态.但这些研究考察的基本都是较高浓度的柠檬醛(通常≥1000 μmol/L)对受体植物的抑制作用,还没有涉及到柠檬醛对植物生长及代谢的促进作用.

本研究以较低浓度的柠檬醛处理拟南芥,以探讨柠檬醛在诱导植物抗旱性方面的潜力.通过转录组测序(RNA-seq)分析柠檬醛处理后诱导的差异表达基因(differentially expressed genes,DEGs),并对 DEGs 进行 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析,分析柠檬醛诱导植物抗旱性增强的可能分子机制,从而为将柠檬醛应用于提高植物的抗旱性打下一定的基础.

2 材料与方法

2.1 材料

实验所用材料为哥伦比亚野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*),由本实验室提供.

柠檬醛(CAS:5392-40-5)购自 Sigma 公司,反转录试剂盒、实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)试剂购自 TaKaRa 公司,实验中所用的其它试剂均为分析纯.

2.2 方 法

2.2.1 柠檬醛的施加和干旱胁迫的处理 拟南芥种子经 75%乙醇、1%次氯酸钠消毒后播种在 MS 培养基上,于 4℃冰箱春化 3 d 后放入光照培养箱中生长.生长条件为:温度 22℃,相对湿度 55%,光照强度 120 μmol·m⁻²·s⁻¹,光周期为 16 h 光照 8 h 黑暗.培养 1 w 后选取生长一致的幼苗移栽到土壤中.拟南芥幼苗在土壤中生长两周后,分别将 200 μmol/L,400 μmol/L,600 μmol/L 和 800 μmol/L 柠檬醛(配制不同工作浓度柠檬醛所用溶剂为 0.1%乙醇)喷洒在拟南芥叶片表面,同时以喷洒水和 0.1%乙醇作为实验的对照组.喷洒时间为每天上午九点,连续喷洒 2 d,喷洒程度以拟南芥叶片上出现水珠且水珠不滴落为宜.喷洒过后用保鲜膜覆盖以防止柠檬醛挥发,3 d 后揭开保鲜膜并停止浇水开始干旱胁迫处理,期间观察各处理组拟南芥的生长情况并拍照记录.干旱 2 w 后进行复水,3 d 后统计各处理组中拟南芥的存活率.

2.2.2 取样及样品 RNA 的提取 叶面喷洒处理结束后,揭开覆膜的同时取 0.1%乙醇对照组(CK)和 200 μmol/L 柠檬醛处理组(Citral)中的拟南芥叶片.CK 和 Citral 分别取 3 个重复,各组的 3 个重复混样后参照本实验室先前建立的方法进行 RNA 的提取^[15].

2.2.3 测序文库的构建与测序 提取的 RNA 经去核糖体 RNA 处理后,通过六碱基随机引物合成 cDNA 第一条链,dUTP 代替 dTTP 合成 cDNA 第二条链的方法进行 cDNA 测序文库的构建.构建的文库质检合格后经 Illumina 平台测序.文库构建和测序工作委托上海生工生物工程有限公司进行.

2.2.4 测序数据的质控及评估 测得的原始数据(raw reads)有各种杂质和非目的序列的污染.利用 FastQC 0.11.2 软件评估原始测序数据的质量,同时通过 Trimmomatic 0.36 软件对测序接头、含有不确定碱基(N)的序列以及低质量序列(碱基质量值 Q30 低于 95%)进行过滤后得到有效的可用数据(clean reads).

2.2.5 DEGs 的筛选 利用 String Tie 1.3.3b 软件计算各样品的转录本丰度,统计各自的表达量.利用 R Package 中的 DEGseq 1.26.0 筛选 DEGs,差异条件的设定阈值为:差异显著性检验值 qValue < 0.05,差异倍数 |log₂FoldChange| > 2.

2.2.6 DEGs 的分析 利用 R Package 中的 topGO 2.24.0 进行 GO 分析,了解差异表达基因可能

具有的生物学功能;利用 R Package 中的 Cluster Profiler 3.0.5 进行 KEGG 富集,分析差异表达基因涉及的代谢通路和调控途径.

2.2.7 DEGs 的 RT-qPCR 验证 从柠檬醛处理后表达量出现显著上调的 DEGs 中筛选 4 个与热激蛋白家族基因(heat shock proteins, HSPs)相关的基因进行 RT-qPCR 验证,即:AT1G07400, AT2G26150, AT4G25200, AT4G12400. 根据基因序列设计引物,引物序列委托上海生工生物工程有限公司合成(见表 1). 利用反转录试剂盒对 RNA 进行反转录得到 cDNA,以 cDNA 为模板,以拟南芥中的 βActin 基因作为内参进行 RT-qPCR. 反应体系为 25 μL: 12.5 μL TB Green Premix Ex Taq II, 1 μL 引物-F, 1 μL 引物-R, 2 μL cDNA 模板, 8.5 μL 无菌水. 反应程序为:95℃, 30 s 预变性, 95℃, 10 s 变性, 58.5℃, 30 s 退火, 72℃, 10 s 延伸, 循环 39 次. 采用 2^{-ΔΔCt} 的方法计算差异基因的相对表达量,每个基因包含 3 次生物学重复和 3 次技术重复. 通过 t 检验分析差异显著性,利用 GraphPad Prism 8.0 绘制结果展示图.

表 1 RT-qPCR 引物序列信息
Tab. 1 The information about primer sequence of RT-qPCR

引物名称 Primer Name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
AT1G07400 -F	GGAGATAGAGGACGACAGTGTG
AT1G07400 -R	CAATAGACTTAAC TTGAGCCCTTC
AT2G26150 -F	GAGGAAACGAGGCTTACTTC
AT2G26150 -R	CATGTCATGTAGATCTTGGCTGTC
AT4G25200 -F	GGCATCTGCTCTCGCTCTTAAG
AT4G25200 -R	CGAAAACGATCAAACACATC
AT4G12400 -F	GAAGGAATACGATAAAGCTATGG
AT4G12400 -R	CTGTCTCATCACTGGATCCGATA
βActin-F	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG
βActin-R	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC

3 结果与分析

3.1 柠檬醛对拟南芥抗旱性的诱导

为了探讨不同浓度柠檬醛处理对拟南芥抗旱性能的影响,拟南芥幼苗经叶面喷施不同浓度柠檬醛后进行两周干旱处理,随后再复水 3 d. 图 1 表型观察显示出,干旱胁迫处理过程中,喷洒水和 0.1%乙醇的对照组中拟南芥叶片萎蔫、植株皱缩和死亡较快. 喷洒柠檬醛的处理组则出现两种截然

不同的趋势:400 $\mu\text{mol/L}$ 以下低浓度柠檬醛处理后的拟南芥在干旱中的生长状况更好,与其他组相比叶片仍能保持嫩绿和坚挺,植株也没有呈现出即死表型;而 600 $\mu\text{mol/L}$ 和 800 $\mu\text{mol/L}$ 高浓度柠檬醛处理后,随着干旱胁迫的进行,植株过早地出现了干枯和死亡. 干旱结束复水后统计不同处理组中拟南芥的存活率,发现各组之间具有显著差异. 如图 2 所示,两个对照组的存活率大约为 40%,低浓度柠檬醛处理后显著提高了拟南芥在干旱胁迫条件下的存活率,尤其在 200 $\mu\text{mol/L}$ 处理下,存活率接近 80%. 但是高浓度柠檬醛处理后的拟南芥在干旱条件下的存活率极低,600 $\mu\text{mol/L}$ 下的存活率仅有 10%~20%,800 $\mu\text{mol/L}$ 处理中的拟南芥在面临干旱时几乎无一存活. 由此可见,200 $\mu\text{mol/L}$ 的柠檬醛可以诱导拟南芥产生抗旱性.

3.2 用于转录组测序文库构建的 RNA 质量分析

为了揭示柠檬醛处理增强拟南芥幼苗抗旱性的分子机制,我们通过 RNA-seq 分析了经 200 $\mu\text{mol/L}$ 柠檬醛处理与未经处理拟南芥幼苗之间的 DEGs,以及受到影响的生理过程与代谢通路. 为了构建转录组分析的测序文库,我们提取了 0.1%乙醇对照组和 200 $\mu\text{mol/L}$ 柠檬醛处理组中拟南芥叶片总 RNA,并利用 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测了 RNA 质量. 所得结果表明(图 3),CK 组和 Citral 组的 RNA 在 5S、18S 和 25S 处有明显单一的吸收峰,峰值较高并且没有杂峰,25S 条带的亮度大约是 18S 的两倍,提取的 RNA 具有很好的完整性. 表 2 数据显示提取的 RNA 浓度均在 1000 ng/ μL 以上,rRNA 量的比值 25S/18S 都大于 2, RNA 完整性检验值 RIN 全部在 8.5 以上,说明提取的 RNA 质量良好,满足后续建库要求.

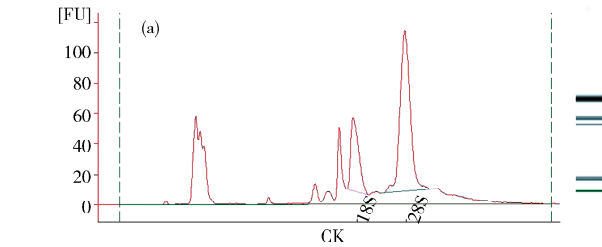


图 3 叶面喷施 0.1%乙醇(a)和喷施 200 $\mu\text{mol/L}$ 柠檬醛(b)的拟南芥叶片 RNA 提取检测结果
Fig. 3 RNA test results of *Arabidopsis thaliana* leaves sprayed by 0.1% ethanol (a) and 200 $\mu\text{mol/L}$ citral (b)

3.3 测序数据的质控评估

对原始测序数据的评估和质控统计汇总结果见表 3. CK 和 Citral 的数据总量相对比较均衡,数据过滤比相差无几,测序数据可信度较高. Q30 可

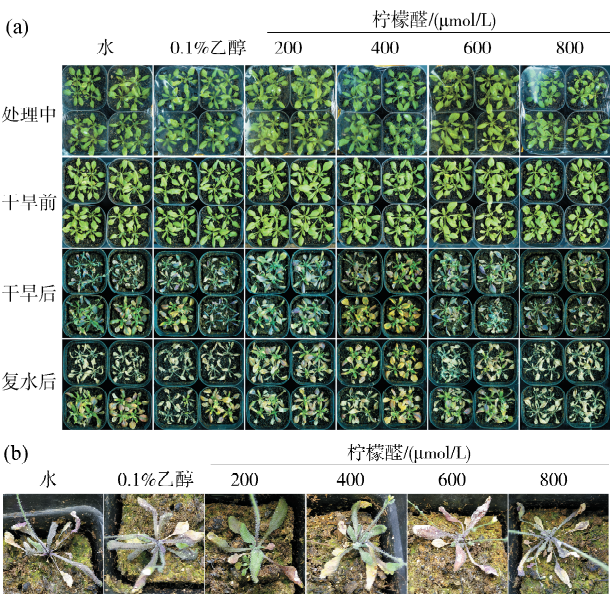


图 1 不同处理后拟南芥在不同时期的生长状态情况
(a) 各阶段总体表型; (b) 干旱 14 d 单个典型植株的表型
Fig. 1 The status of *Arabidopsis thaliana* in different stages induced by different treatments
(a) The overall phenotype at each stage; (b) the representative phenotype of a signal plant after drought 14 d

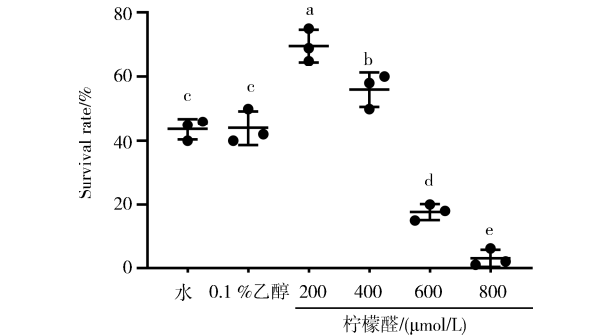
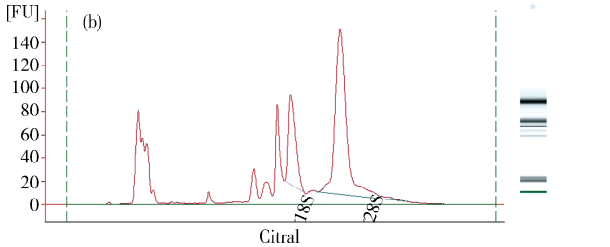


图 2 不同处理组干旱复水后拟南芥的存活率
不同字母代表不同处理中拟南芥存活率的差异显著性($P<0.05$)
Fig. 2 Survival rate of *Arabidopsis thaliana* after drought and rehydration in different treatment groups
Different letters represent the significant difference of *Arabidopsis thaliana* survival rate in different treatments ($P<0.05$)



以作为评估碱基测序质量的优秀线,结果显示所有样本的 Q30 值均在 95%以上,测序质量良好. 同时测序数据与拟南芥参考基因组的比对率在 95%以上,数据符合模式物种的比对率(一般在 90%左

右,不低于 80%). 从数据的质控结果和评估分析可以判断出所测数据真实有效、可信可用,完全可以用于后续转录组分析.

表 2 叶面喷施 0.1%乙醇(CK)和喷施 200 μmol/L 柠檬醛(Citral)的拟南芥叶片 RNA 质量信息

Tab. 2 RNA information of *Arabidopsis thaliana* leaves sprayed by 0.1% ethanol (CK) and 200 μmol/L citral (Citral)

名称	浓度/(ng/μL)	25S/18S	RIN	质量	结论
CK	1166	2.5	8.7	A	合格
Citral	1747	2.6	8.5	A	合格

表 3 拟南芥叶面喷施 0.1%乙醇对照组(CK)和 200 μmol/L 柠檬醛处理组(Citral)的测序数据质控信息

Tab. 3 Quality control information about sequencing data of the CK and Citral with *Arabidopsis thaliana* leaves sprayed by 0.1% ethanol and 200 μmol/L citral, respectively

样本名称	Raw total reads	QC total reads	过滤比/%	Mapping 比率/%	Q30 bases count/bp	Q30 bases ratio/%	GC bases count/bp	GC bases ratio/%
CK	59 351 046	58 344 442	1.70	96.44	7 890 078 853	95.67	3 777 107 518	45.80
Citral	52 794 658	51 907 522	1.68	97.78	7 026 455 632	95.39	3 394 166 097	46.08

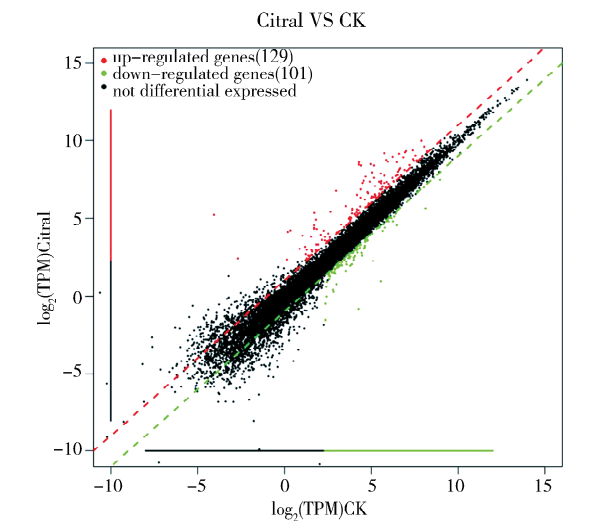


图 4 拟南芥叶面喷施 0.1%乙醇对照组(CK)和 200 μmol/L 柠檬醛处理组(Citral)间的差异表达基因

Fig. 4 Differentially expressed genes between the CK and Citral with *Arabidopsis thaliana* leaves sprayed by 0.1% ethanol and 200 μmol/L citral, respectively

3.5 DEGs 的 GO 和 KEGG 分析

GO 功能注释主要提供有关于生物进程(biological process)、细胞组分(cellular component)以及分子功能(molecular function)三方面的信息. 图 5 对 DEGs 的 GO 分类结果显示,DEGs 在生物进程中主要富集到的条目是:应激反应、多组织进程、

3.4 柠檬醛处理后的 DEGs 分析

通过计算不同处理样本的基因表达水平和设定差异条件进行筛选后,得到了柠檬醛处理组和对照组之间的 DEGs,结果见图 4 可视化散点图. 图中黑点代表基因表达水平在两组中没有差异,红点表示柠檬醛处理组相较于对照组表达水平上调的基因,绿点代表柠檬醛处理组中下调表达的基因. 图 4 直观地反映出与在拟南芥叶片上喷洒 0.1%乙醇的对照组相比,处理组中喷洒 200 μmol/L 柠檬醛后共出现 230 个 DEGs,其中 129 个上调表达,101 个下调表达.

生物调控、免疫系统进程、细胞进程等. 在细胞组分中富集到的主要为:细胞及细胞组件、其它组织及其组件、细胞器、细胞膜、核苷等. 主要富集的分子功能有:结合、蛋白标签、抗氧化活性、催化活性、酶调节活性等.

同时,KEGG 分析有助于全面了解 DEGs 所涉及的代谢途径,对 DEGs 进行 KEGG 通路富集分析发现差异基因显著富集在 52 条代谢通路上. 按富集因子及显著性排序,前 10 条依次为:内质网中的蛋白质加工、抗原处理和递呈、雌激素信号通路、多物种长寿调节途径、植物与病原体互动、MAPK 信号通路、NOD-like 受体信号通路、胞吞作用、精氨酸和脯氨酸代谢、氮代谢.

3.6 DEGs 的 RT-qPCR 验证

柠檬醛处理后表达量出现显著上调的基因许多都与 HSPs 相关,从中筛选出差异表达倍数较高的 4 个基因,即 AT1G07400, AT2G26150, AT4G25200, AT4G12400,进行 RT-qPCR 验证. 图 7 结果表明,4 个基因在 RT-qPCR 中的表达水平变化趋势和转录组中分析出的变化情况一致. 因此本研究中的测序和差异基因表达分析结果具有良好的可信度和可靠性.

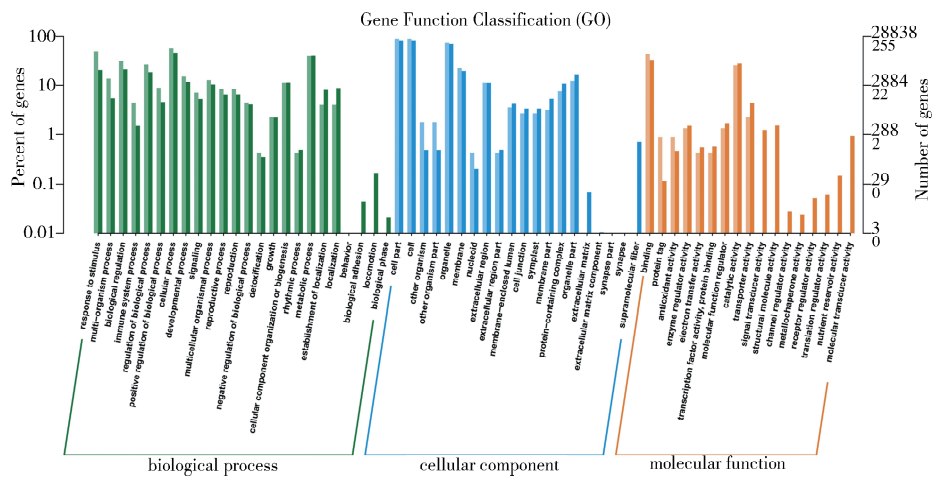


图 5 差异表达基因的 GO 功能富集

Fig. 5 GO function enrichment of differentially expressed genes

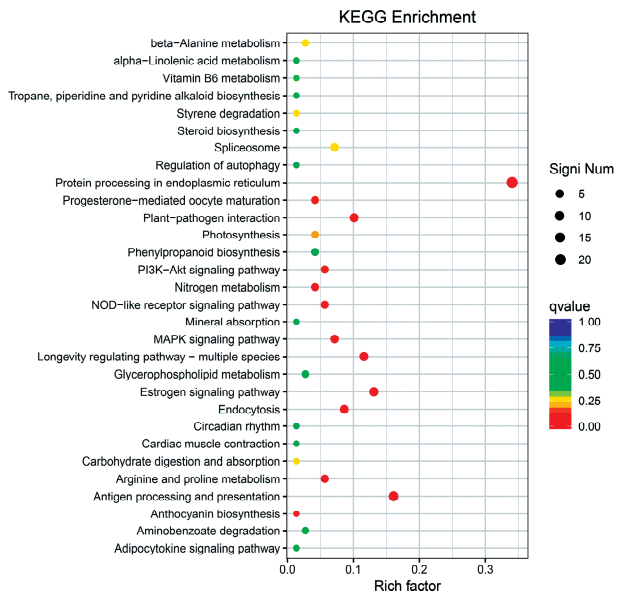


图 6 差异表达基因的 KEGG 通路富集

Fig. 6 KEGG pathway enrichment of differentially expressed genes

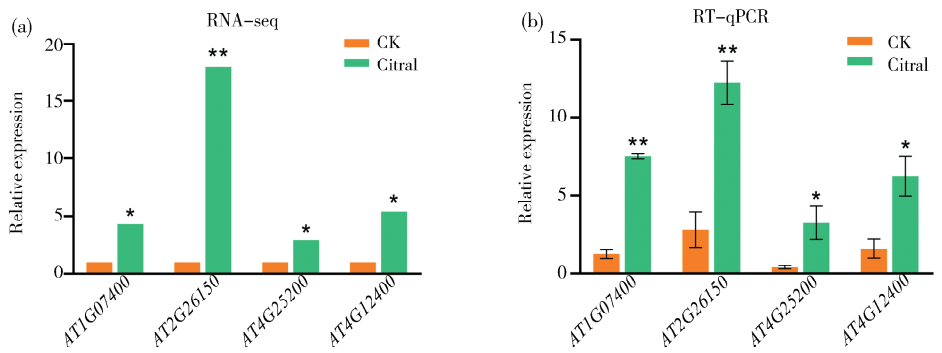


图 7 转录组数据中差异表达基因的实时荧光定量 PCR 验证

(a) 转录组数据分析的差异表达基因相对表达量(以未经柠檬醛处理的对照组 CK 中基因表达量为 1); (b) 荧光定量 PCR 验证的柠檬醛处理组 Citral 和对照组 CK 中差异表达基因相对表达量(以 $\beta Actin$ 的表达量为 1)

* 代表相较于对照组 CK 的差异显著水平 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

Fig. 7 RT-qPCR verification of DEGs in RNA-seq

(a) The relative expression of DEGs analyzed by RNA-seq (take the gene expression level of CK as 1); (b) the relative expression of DEGs in Citral and CK verified by RT-qPCR (take the expression level of $\beta Actin$ as 1)

The asterisk represents the significant level of difference compared to the CK (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

4 讨 论

Graña 等^[13]证明柠檬醛会破坏拟南芥的水分状态,柠檬醛处理的拟南芥生长缓慢,适应性变差,种子存活数量减少,生殖和繁殖也受到了严重的抑制,对拟南芥来说是一种有害的刺激物.但需要指出的是 Graña 等使用的柠檬醛工作浓度一般都比较高($\geq 1000 \mu\text{mol/L}$),并且通常采用每天对植物进行叶面喷洒或者每两天进行一次根部浇灌的连续处理方式^[11-13].本研究通过改变柠檬醛的工作浓度和作用方式以考察柠檬醛是否可以作为诱导物增强拟南芥的抗旱性,并借助转录组测序技术深入探讨柠檬醛诱导抗旱性的分子机理.

为避免柠檬醛的持续作用给植物带来的强烈伤害,本研究处理材料的方式为:将柠檬醛喷洒在拟南芥叶片表面且 3 d 的处理过程只喷洒两次.同时,我们还降低了柠檬醛的工作浓度.我们通过设置 $200 \mu\text{mol/L}$, $400 \mu\text{mol/L}$, $600 \mu\text{mol/L}$, $800 \mu\text{mol/L}$ 四个浓度梯度的柠檬醛工作浓度处理拟南芥幼苗,以寻找柠檬醛诱导拟南芥产生抗旱性的适宜浓度.实验结果表明,与对照组和较高浓度柠檬醛处理组相比, $200 \mu\text{mol/L}$ 低浓度柠檬醛可以诱导拟南芥抗旱性的产生,其处理后明显改善了拟南芥在干旱环境中的适应性,最后的存活率高达 80%,而未经柠檬醛处理的对照组只有 40% 左右的存活率(图 2).

大量的研究表明,当植物被病原菌感染,或者根部定植有益微生物,或者经一些天然或人工化合物诱导后,会表现出对随后的病菌感染、昆虫咬食、非生物胁迫等更快更强的适应性和抵抗力,这一过程称为引发效应(priming)^[16].本研究用 $200 \mu\text{mol/L}$ 柠檬醛处理拟南芥后,使得拟南芥对后续干旱胁迫的耐受性增强(图 1).因此,从现象上分析,柠檬醛也可以作为一种引发效应的诱导物,其处理后诱导了拟南芥的引发效应,从而使拟南芥在后续的干旱胁迫中表现出了更强的适应性和更好的抵抗能力.

为深入了解柠檬醛处理后基因表达水平的变化,尤其是防御相关基因的表达变化,我们通过 RNA-seq 分析了经 $200 \mu\text{mol/L}$ 柠檬醛处理后的 DEGs. 结果发现经柠檬醛处理后共有 230 个 DEGs,其中 129 个上调表达的基因中有许多都是和 HSPs 相关的基因:如 HSP20-like 伴侣蛋白编码基因 AT1G07400,热激蛋白转录因子 A2(HS-

FA2)编码基因 AT2G26150,定位于线粒体的小热激蛋白 AT4G25200,还有和 HSP90/HSP70 共同作为伴侣蛋白发挥作用的 AT4G12400 等.随后设计引物通过 RT-qPCR 也证实这些基因的确会在柠檬醛处理后出现显著上调(图 7). HSPs 是具有保护作用的应激蛋白,在蛋白质的折叠以及调节细胞免疫等方面发挥着重要作用,其存在于所有的植物物种中,因与植物的胁迫有关也被称为胁迫防御蛋白^[17]. HSPs 通常作为分子伴侣发挥作用以维持蛋白质的稳态.在逆境条件下一些功能蛋白变得不稳定会出现部分解折叠,此时 HSPs 被激活后以一种不消耗能量的方式和部分解折叠的蛋白质结合以防止蛋白质出现不可逆聚集,保护蛋白质使其保持可被正确折叠的状态.而后,与 HSPs 结合的功能蛋白通过依赖 ATP 的方式重新折叠为天然活性构象,进而恢复其正常的生理活性^[18]. DEGs 的 GO 注释中富集到最多的功能条目是应激反应(图 5),KEGG 通路富集结果表明 DEGs 显著富集在内质网中的蛋白质加工处理(图 6),这和 HSPs 参与植物的应激防御以及在柠檬醛处理后表达量升高是一致的^[19].

已有研究表明,HSPs 在植物的干旱胁迫中发挥着重要的功能.例如 Kim 等^[20]发现过表达 AtHSP17.8 (AT1G07400) 可以增强拟南芥和生菜对脱水的抵抗力;Sun 等^[21]证实 AtHSP17.6A (AT5G12030) 的过表达能够提高拟南芥的耐旱性;Li 等^[22]发现 Hsp17.6CII (AT5G12020) 可以增加过氧化氢酶的活性.过氧化氢酶是一种重要的抗氧化酶,可以清除逆境条件下植物体内产生的活性氧,其活性可作为衡量抗旱能力的指标之一,一般情况下其活性越高,抗旱性越强^[22].柠檬醛诱导拟南芥抗旱过程中 HSPs 相关基因出现大量上调表达,但同时发现一些具有抗旱作用的功能蛋白编码基因如抗氧化酶系中的超氧化物歧化酶 SOD (AT1G08830)、过氧化物酶 POD (AT1G05240)、过氧化氢酶 CAT (AT1G19570) 等基因的表达量未发生明显的变化(数据未列).表明柠檬醛的处理并未直接活化抗氧化防御基因的表达,而是在引发效应的启动阶段通过某种途径激活了热激转录因子(如 HSFA2 等)的活性,进而活化 HSPs 的表达,使得植株处于对后续干旱胁迫更为敏感的状态.从而在后续的干旱胁迫下,通过 HSPs 的分子伴侣功能使逆境下部分解折叠的抗旱功能蛋白保持生理活性的稳态,显示出对干旱胁迫更好的适应

性和抵抗力^[17, 18].

综上所述,本研究首次发现柠檬醛在诱导拟南芥抗旱方面的潜力,并通过差异基因分析探讨了柠檬醛提高拟南芥抗旱性的可能分子机制.研究结果为进一步挖掘柠檬醛在农业生产中的潜在应用价值,尤其是开发植物生长促进剂和植物抗旱保护剂提供了参考,也为提高植物的抗旱性提供了新的思路 and 方向.

参考文献:

- [1] 韩兰英, 张强, 程英, 等. 农业干旱灾害风险研究进展及前景分析[J]. 干旱区资源与环境, 2020, 34: 97.
- [2] 袁星, 马凤, 李华, 等. 全球变化背景下多尺度干旱过程及预测研究进展[J]. 大气科学学报, 2020, 43: 230.
- [3] 杨艳君, 胡变芳, 潘玉峰, 等. 一种抗旱优质谷子的选育方法: CN202010489906. X[P]. 2020-08-11.
- [4] 邓亚男, 刘志斌, 王健美, 等. 过表达 E3 泛素连接酶 ABRv1 通过泛素化 CPK3 提高拟南芥干旱耐受[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2018, 55: 613.
- [5] 孔垂华. 中国植物化感作用研究 16 年[J]. 应用生态学报, 2020, 31: 2139.
- [6] 蔡观容, 陈桂华. 甜高粱浸提液对牧草种子萌发和幼苗的化感作用[J]. 作物研究, 2018, 32: 415.
- [7] 邬若兰, 尹维, 廖晓兰. 植物化感作用防治植物病害研究进展[J]. 农业灾害研究, 2013, 7: 42.
- [8] 许艳, 夏中梅, 王强锋, 等. 植物生长逆境保护剂及使用方法: CN201911279802. X[P]. 2020-04-07.
- [9] Munir R. Evaluating the role of allelopathy in improving the resistance against heat and drought stresses in wheat [D]. Faisalabad, Pakistan; Department of Agronomy, University of Agriculture, 2001.
- [10] 和承尧. 富含柠檬醛精油植物资源综合利用[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2008: 7.
- [11] Graña E, Sotelo T, Díaz-Tielas C, *et al.* The phytotoxic potential of the terpenoid citral on seedlings and adult plants [J]. Weed Sci, 2013, 61: 469.
- [12] Graña E, Sotelo T, Díaz-Tielas C, *et al.* Citral induces auxin and ethylene-mediated malformations and arrests cell division in *Arabidopsis thaliana* roots [J]. J Chem Ecol, 2013, 39: 271.
- [13] Graña E, Díaz-Tielas C, López-González D, *et al.* The plant secondary metabolite citral alters water status and prevents seed formation in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Biol, 2016, 18: 423.
- [14] Chaimovitsh D, Rogovoy O, Altshuler O, *et al.* The relative effect of citral on mitotic microtubules in wheat roots and BY2 cells [J]. Plant Biol, 2012, 14: 354.
- [15] Zhang N H, Yu D, Zhu X F. RNA isolation from plant tissues: A hands-on laboratory experimental experience for undergraduates [J]. Biochem Mol Bio Educ, 2018, 46: 253.
- [16] Conrath U, Beckers G J M, Flors V, *et al.* Priming: Getting ready for battle [J]. Mol Plant Microbe Interact, 2006, 19: 1062.
- [17] Waters E R, Vierling E. Plant small heat shock proteins-evolutionary and functional diversity [J]. New Phytol, 2020, 227: 24.
- [18] Haslbeck M, Vierling E. A first line of stress defense: small heat shock proteins and their function in protein homeostasis [J]. J Mol Biol, 2015, 427: 1537.
- [19] Baniwal S K, Bharti K, Chan K Y, *et al.* Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors [J]. J Biosciences, 2004, 29: 471.
- [20] Kim D H, Xu Z Y, Hwang I. *AtHSP17.8* overexpression in transgenic lettuce gives rise to dehydration and salt stress resistance phenotypes through modulation of ABA-mediated signaling [J]. Plant Cell Rep, 2013, 32: 1953.
- [21] Sun W, Bernard C, Cotte B V D, *et al.* *AtHSP17.6A*, encoding a small heat-shock protein in *Arabidopsis*, can enhance osmotolerance upon overexpression [J]. Plant J, 2001, 27: 407.
- [22] Li G N, Li J, Hao R, *et al.* Activation of catalase activity by a peroxisome-localized small heat shock protein Hsp17.6CII [J]. J Genet Genomics, 2017, 44: 395.

引用本文格式:

中文: 张明迪, 白九元, 王鑫, 等. 柠檬醛诱导的拟南芥抗旱性及差异表达基因分析[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2022, 59: 016001.

英文: Zhang M D, Bai J Y, Wang X, *et al.* Citral-induced drought resistance in *Arabidopsis thaliana* and analysis of differentially expressed genes [J]. J Sichuan Univ: Nat Sci Ed, 2022, 59: 016001.