

茶树 CAD 基因家族的鉴定与表达分析及小贯小绿叶蝉为害对其表达的影响

杨欢, 阮玲玲, 闫佳伟, 任卫威, 柳紫琼, 金珊*

福建农林大学园艺学院/茶学福建省高校重点实验室, 福建福州 350002

摘要: 肉桂醇脱氢酶 (cinnamyl alcohol dehydrogenase, CAD) 是木质素生物合成途径的一类关键酶, 主要负责催化木质素单体生物合成途径的最后一步反应。为了探究茶树 CAD 基因家族的潜在功能, 本研究利用生物信息学技术, 在茶树黄桫基因组中对 CAD 基因进行鉴定, 并基于转录组数据研究它们在茶树不同组织中及小贯小绿叶蝉为害后其基因表达的情况。研究结果表明: 鉴定获得 36 个 CAD 基因家族成员, 分别命名为 *HD-CsCAD-1~HD-CsCAD-36*, 不均匀地分布于 9 条染色体上, 编码氨基酸长度为 300~621 aa, 蛋白分子量为 321.40~666.49 kDa。*HD-CsCADs* 有 0~3 个内含子, 启动子中含有 79 种顺式作用元件, 其中与逆境胁迫响应相关的元件数量最多。进化树分析结果表明, *HD-CsCADs* 可分为 4 个亚家族。*HD-CsCADs* 在茶树的组织中表达量存在明显差异, *HD-CsCAD-15* 与其他植物参与木质素生物合成的 CAD 基因高度同源, 并在茎组织中高度表达。此外, 还分析它们在茶苗遭受小贯小绿叶蝉为害后的表达情况, 其中 *HD-CsCAD-11* 和 *HD-CsCAD-15* 的表达水平显著上升, 可作为研究茶树抗虫防御机制的关键候选基因。本研究结果可为茶树 CAD 基因功能的验证及抗虫防御分子机制的研究提供一定的理论依据。

关键词: 茶树; 肉桂醇脱氢酶基因; 基因家族; 木质素; 小贯小绿叶蝉

中图分类号: S435.711

文献标志码: A

Identification and Expression Analysis of the CAD Gene Family in Tea Plant (*Camellia sinensis*) and Their Response to Infestation by *Empoasca onukii*

YANG Huan, RUAN Lingling, YAN Jiawei, REN Weiwei, LIU Ziqiong, JIN Shan*

College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University / Key Laboratory of Tea Science of Fujian Provincial University, Fuzhou, Fujian 350002, China

Abstract: During the biosynthesis process of lignin in plants, cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) plays a crucial role, catalyzing the final step reaction in the entire metabolic pathway. To explore the potential functions of the CAD gene family in tea plants, CAD gene family members were identified in the genome of Huangyan tea plants and a series of bioinformatics analyses were conducted. Based on transcriptome data, the gene expression of the members in different organs of tea plants and after damage by the *Empoasca vitis* were studied. A total of 36 members of *HD-CsCADs* were identified, which were unevenly distributed on 9 chromosomes and encoded amino acid lengths ranging from 300 aa to 621 aa and protein molecular weights ranging from 321.40 kDa to 666.49 kDa. *HD-CsCADs* had 0 to 3 introns and the promoters containing 79 types of cis-acting elements, among which the number of elements related to stress response was the highest. Combined with the phylogenetic tree, *HD-CsCADs* could be divided into 4 subfamilies. There were significant differences in the expression levels of *HD-CsCADs* in different organs of tea plants. *HD-CsCAD-15*

收稿日期 2025-04-27; 接受日期 2025-06-13

基金项目 中国乌龙茶产业协同创新中心开放研究基金项目 (No. 2024W02); 福建张天福茶叶发展基金会科技创新基金项目 (No. FJZTF01)。

作者简介 杨欢 (2001—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 茶树抗虫分子机制。*通信作者 (Corresponding author): 金珊 (JIN Shan), E-mail: jinshan0313@163.com。

was highly homologous to CAD genes involved in lignin biosynthesis in other plants and was highly expressed in stem tissues. In addition, the expression of the genes after damage by *E. vitis* on tea seedlings was analyzed. The expression of *HD-CsCAD-11* and *HD-CsCAD-15* was relatively obvious and could be used as important CAD genes related to lignin metabolism and tea plant defense against pests. The results would provide theoretical basis for the defense mechanism of tea plants against the small green leaf hopper and the utilization of CAD gene functions.

Keywords: tea plant; CAD gene; gene family; lignin; *Empoasca vitis*

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.10.004

茶 [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze.] 是一种具有悠久历史的山茶科 (Theaceae Mirb.) 山茶属 (*Camellia* L.) 的常绿灌木或小型乔木^[1], 广泛分布在多个国家, 是最古老的树种之一^[2]。在传统的中医中, 茶树被用作草药和兴奋剂, 用于促进消化、解毒、调节血糖和体温以及伤口愈合等^[3]。茶树芽和叶均可用于制作茶叶, 其馥郁的香气和独特的滋味深受全世界的喜爱。中国是茶叶的原产地和最大生产国, 其茶树的种植面积和总产量均居全球首位^[4]。目前气候的不断变化、病虫害频发及土壤退化等问题严重威胁着茶叶的产量与品质^[5]。

木质素作为植物细胞壁中的一种重要结构组分, 在植物体内的含量仅次于纤维素, 是一种重要的酚类聚合物^[6]。木质素在细胞壁中的沉积不仅增强了植物整体的机械支撑能力, 还在抵御病原体入侵、干旱胁迫等生物与非生物逆境中发挥重要防护作用^[7]。木质素的形成是通过苯丙烷代谢途径实现的^[8], 这一过程需要多种酶的协同作用。在植物体内木质素的生物合成过程中, 肉桂醇脱氢酶 (cinnamyl alcohol dehydrogenase, CAD) 起到了至关重要的作用, 它负责催化整个合成代谢途径中的最后一步反应。在氧化型辅酶 NADP 的作用下, CAD 能够催化肉桂醛 (如香豆醛、芥子醛、松柏醛等) 转化为肉桂醇^[9]。CAD 基因家族已在多个植物中被鉴定, 例如: 在水稻 (*Oryza sativa*) 中有 12 个^[10], 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中有 9 个^[11], 在谷子 (*Setaria italica*) 中有 13 个^[12], 在小麦 (*Triticum aestivum*) 有 47 个^[13] 等。研究表明, CAD 基因可直接参与植物体内木质素的生物合成, 例如: 水稻中的 *OsCAD2*^[10] 和高粱 (*Sorghum bicolor*) 中的 *SbCAD2*^[14] 可直接催化木质素的前体物质转化, 是木质素合成中的核心调控基因。在拟南芥中 *AtCAD5* 主要参与花茎的木质素生物合成^[11]; 梨 (*Pyrus* spp.) 的 *PpCAD2* 在番茄 (*Solanum lycopersicum*) 中的过表达显著

提升了番茄植株中的木质素沉积^[15]。除此之外, CAD 基因也参与植物体内的非生物逆境的胁迫响应, 例如: 在水稻中, *OsCAD2* 和 *OsCAD6* 的表达明显受到 UV 处理诱导, 说明其对水稻抵御 UV 辐射有重要影响^[16]; 小麦的 *TaCAD12* 被发现能够增强小麦对纹枯病的抗性^[17]。综上, CAD 基因家族可能通过各自的调控机制介导植物体内木质素合成的不同通路, 同时又参与植物体内非生物逆境的胁迫反应, 这充分体现了木质素在植物生理过程中所表现出的多功能特性^[18]。

小贯小绿叶蝉 (*Empoasca onukii* Matsuda) (以下简称叶蝉) 以其刺吸式口器刺吸茶树的嫩叶或嫩茎, 导致茶树产生叶脉红变、叶缘卷曲, 甚至引发“叶蝉烧”等症状。叶蝉种群呈高密度分布特征, 且具备快速繁殖的能力, 对茶树的正常生长发育造成严重威胁, 进而也影响茶叶的产量和品质^[19-21]。因此, 研究茶树对叶蝉的防御机制, 是利用茶树品种抗虫性、提升茶叶质量的重要基础。

青心大有是中国台湾地区最具代表性、种植最广泛的茶树品种之一, 后引入福建省, 青心大有茶树鲜叶是制作美人茶的重要原料^[22]。然而, 针对青心大有相关研究较少, 也缺乏基因组数据的支撑。本课题组前期组装了高香型乌龙茶栽培品种“黄棪”的染色体级别基因组^[23], 可为乌龙茶茶树品种的基因鉴定提供参考。另一方面, CAD 基因对木质素的合成及调控研究主要体现在改良树木品种、抗倒伏和抗病害等方面, 与植物抗虫关系的报道较少^[24]。目前, 只在茶树中克隆鉴定了 3 个与茶尺蠖 (*Ectropis obliqua* Prout) 取食诱导相关的 CAD 基因^[25]。本研究利用课题组前期的基因组数据对茶树 CAD 基因家族进行鉴定并对其进行生物信息学分析, 包括理化特性、系统发育分析、染色体定位、保守序列及顺式作用元件分析等特征分析, 同时通过转录组数据分析在茶树不同组织中及在叶蝉胁迫处理下 CAD 成员的表达模式, 为今后深入研究 CAD 基

因在茶树抗虫防御以及茶品质形成中的分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料来源于福建农林大学茶学福建省高校重点实验室温室, 选取生长良好、无病虫害的一年半生青心大有盆栽茶苗。试验所用的小贯小绿叶蝉 (*Empoasca onukii* Matsuda) (以下简称叶蝉) 成虫采自福建农林大学教学茶场, 参考闫佳伟等^[26]的方法, 采用双层 parafilm 膜夹营养液法提取叶蝉唾液蛋白, 并在液氮中冷冻, 置于 -80 °C 冰箱中保存备用。

1.2 方法

1.2.1 茶苗处理 参考闫佳伟等^[26]的方法, 选取茶苗进行处理。(1) 对照组 (CK): 选取健康无病虫害的 4 盆茶苗, 不做任何处理。(2) 机械损伤组 (MD): 选取健康无病虫害的 4 盆茶苗, 在嫩芽处用 00# 昆虫针刺刺 50~80 针, 造成叶片机机械损伤。(3) 叶蝉取食组 (CH): 选取健康无病虫害的茶苗 4 盆, 分别用透气尼龙网罩罩住, 每盆放入约 50 头叶蝉成虫。(4) 机械损伤+唾液蛋白组 (SM): 选取 4 盆机械损伤茶苗, 将提取的叶蝉唾液蛋白均匀地涂抹在机械损伤叶的叶片两面。(5) 唾液处理组 (SD): 选取健康无病虫害的茶苗 4 盆, 将纯化的唾液蛋白均匀涂抹在健康叶片两面。以上处理在 0 h 时均用透气的尼龙网罩覆盖, 并放在相同的条件下 (温度 26 °C, 相对湿度 70%, 光周期 L:D=16:8) 处理 48 h。在处理后的 12、24、48 h 分别进行采样。每次采摘 2~3 片一芽二叶嫩茶稍后放入铝箔袋中, 每个处理组均进行 3 次生物学重复, 立即置于液氮中冷冻, 并储存于 -80 °C 冰箱中备用。

1.2.2 茶树 CAD 基因家族成员的鉴定 为了鉴定茶树中的 CAD 基因家族成员, 分别从茶树网站 (<http://tpia.teaplants.cn/>) 和 Pfam 数据库 (<https://pfam.xfam.org/>) 中下载黄桉基因组数据和 CAD 保守域 (PF00107 和 PF08240) 的隐马尔可夫模型 (HMM) 配置文件, 在 TBtools 中使用 Simple HMM Search 程序进行筛选, 获得候选序列。利用 SMART (<https://smart.embl.de/smart/batch.pl>) 和 NCBI CCD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) 网站进行结构域验证, 去除结构域不完整的基因序列, 最终确定茶树的 CAD

基因家族成员。

1.2.3 茶树 CAD 基因家族蛋白理化性质分析与系统发育分析 利用在线工具 SignalP-4.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>) 和 TMHMM (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) 分别进行 CAD 蛋白的信号肽分析和跨膜结构预测, 使用 TBtools-Protein Paramter Calc 进行氨基酸数量、分子量和等电点分析, 同时在 WOLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 上进行成员亚细胞定位预测。通过 MEGA 软件, 构建拟南芥^[11]、水稻^[10]、毛白杨 (*Populus tomentosa* Carrière)^[24]、小麦^[13]、火炬松 (*Pinus taeda* L.)^[25]、油棕 (*Elaeis guineensis* Jacq.)^[27] 的 CAD 基因与所鉴定得到的茶树 CAD 家族基因的系统发育树, 利用网站 (<https://www.evolgenius.info/evolview/>) 进行进化树的美化, 并对确定的 CAD 基因家族成员进行亚家族分类。

1.2.4 茶树 CAD 基因家族染色体定位及保守基序分析 使用 TBtools 软件中的 Gene Location Visualize from GFF/GTF 程序进行 CAD 基因染色体定位分析。利用在线工具 MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 对 CAD 蛋白保守基序 motif 进行茶树 CAD 家族成员蛋白全长的保守基序 (motif) 分析, 并利用 TBtools-Gene Structure View (Advanced) 对结果进行可视化。

1.2.5 茶树 CAD 基因启动子顺式元件分析 利用在线工具 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 对顺式作用元件的数目进行预测, 并在 TBtools 中对结果进行可视化。

1.2.6 茶树 CAD 基因共线性分析和蛋白互作预测 使用 TBtools 工具进行茶树物种内的共线性分析, 并使用 MCSanX 工具预测拟南芥和黄桉不同物种间的同源基因。利用 TBtools 软件确定拟南芥的 CAD 基因和茶树 CAD 基因之间的共线关系, 并进行可视化。同时在 STRING (<https://cn.string-db.org/>) 上进行蛋白互作网络分析。

1.2.7 茶树 CAD 基因的组织特异性表达分析 下载黄桉的转录组数据, 参照前人的方法^[19]得到 *HD-CsCADs* 在芽、嫩叶、老叶、茎和根上的 FPKM 值, 利用 TBtools 软件绘制基因在茶树不同组织上的特异表达热图。

1.2.8 转录组数据分析 将 1.2.1 准备的材料采用 RNA 提取试剂盒 (FastPure Universal Plant

Total RNA Isolation Kit, 南京 Vazyme 公司) 提取茶树叶片的总 RNA, 样品委托上海中科新生命生物科技有限公司进行转录组测序。从转录组数据中提取目的基因的 FPKM 值, 经过转换计算后进行图表绘制。

2 结果与分析

2.1 茶树 CAD 基因家族成员的鉴定及蛋白理化性质分析

使用 CAD 的隐马尔可夫模型文件 (PF) 并应用 hmmer 软件在黄桉蛋白文件中建立 CAD 蛋白序列 ($E \leq e^{-5}$), 经过 CDD 和 SMART 保守结构域分析, 在黄桉基因组中共鉴定出 36 个 *HD-*

CsCAD (表 1)。将确定的 CAD 基因家族成员命名为 *HD-CsCAD-1~HD-CsCAD-36*。茶树 CAD 基因亚细胞定位预测分析表明, 细胞质上有 27 个 (75.00%) 成员, 叶绿体上有 4 个 (11.11%) 成员, 细胞骨架和细胞外基质上分别有 2 个 (0.06%) 成员, 过氧化物酶体上有 1 个 (0.03%) 成员。氨基酸序列长度介于 300~621 aa 之间, 分子量介于 321.40~666.49 kDa 之间, 理论等电点介于 5.35~7.92 之间, 其中有 32 个是酸性蛋白, 4 个是碱性蛋白。不稳定系数介于 19.37~48.46 之间, 平均亲水性介于 -0.124~0.174 之间, 14 个蛋白具有亲水性, 其他均具有疏水性。预测跨膜螺旋数量均为 0, 均不含有信号肽。

表 1 茶树 CAD 基因家族成员的序列特征
Tab. 1 Sequence characteristics of tea CAD gene family members

基因 Gene	基因 ID Gene ID	长度 Length/aa	分子量 MW/kDa	等电点 PI	不稳定系数 Instability	脂肪数 AI	亲水性 GRAVY	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>HD-CsCAD-1</i>	HD.02G0030910.t1	365	395.11	6.83	31.17	89.45	0.013	细胞质
<i>HD-CsCAD-2</i>	HD.02G0030870.t1	367	393.70	5.70	31.15	87.87	0.093	细胞质
<i>HD-CsCAD-3</i>	HD.02G0030900.t1	367	394.21	5.66	33.27	86.81	0.097	细胞质
<i>HD-CsCAD-4</i>	HD.01005610.t1	356	379.44	6.75	22.16	88.40	0.174	细胞质外质
<i>HD-CsCAD-5</i>	HD.01005605.t1	359	383.76	7.50	21.48	90.92	0.173	叶绿体
<i>HD-CsCAD-6</i>	HD.05G0007720.t1	361	389.61	6.31	28.63	93.93	0.057	细胞质
<i>HD-CsCAD-7</i>	HD.04G0022770.t1	361	390.33	6.31	28.83	93.38	0.064	细胞质
<i>HD-CsCAD-8</i>	HD.04G0026700.t1	359	384.75	6.63	27.00	97.41	0.162	细胞质
<i>HD-CsCAD-9</i>	HD.04000767.t1	364	398.00	6.45	26.31	88.87	-0.124	过氧化物酶体
<i>HD-CsCAD-10</i>	HD.1209294.t1	356	383.07	6.63	23.93	94.69	0.108	细胞质
<i>HD-CsCAD-11</i>	HD.03G0033730.t1	356	383.07	6.63	23.93	94.69	0.108	细胞质
<i>HD-CsCAD-12</i>	HD.02G0008450.t1	360	386.87	6.94	27.12	90.17	0.007	细胞质
<i>HD-CsCAD-13</i>	HD.10G0022480.t1	440	470.45	7.90	48.46	85.80	-0.019	叶绿体
<i>HD-CsCAD-14</i>	HD.04G0022660.t1	361	389.52	6.63	28.49	94.21	0.049	细胞质
<i>HD-CsCAD-15</i>	HD.13G0019690.t1	357	389.51	5.35	27.28	91.88	-0.029	细胞骨架
<i>HD-CsCAD-16</i>	HD.01G0026210.t1	300	321.40	6.78	30.99	93.83	0.089	细胞质
<i>HD-CsCAD-17</i>	HD.02G0008490.t1	360	389.99	7.20	25.74	92.61	-0.012	细胞质
<i>HD-CsCAD-18</i>	HD.04G0022810.t1	356	382.42	6.82	30.48	97.72	0.154	细胞质
<i>HD-CsCAD-19</i>	HD.05G0028420.t1	357	389.08	5.53	19.37	93.22	0.043	细胞质
<i>HD-CsCAD-20</i>	HD.02G0008470.t1	621	666.49	6.60	29.17	91.80	-0.014	细胞质
<i>HD-CsCAD-21</i>	HD.01G0026200.t1	360	390.49	5.90	28.07	94.44	0.055	细胞质
<i>HD-CsCAD-22</i>	HD.06G0017630.t1	356	387.56	6.26	24.99	86.46	-0.017	叶绿体
<i>HD-CsCAD-23</i>	HD.04008754.t1	360	395.54	6.46	27.83	86.31	-0.053	细胞质
<i>HD-CsCAD-24</i>	HD.07012446.t1	359	384.88	6.37	28.27	87.94	0.096	细胞质外质
<i>HD-CsCAD-25</i>	HD.04008762.t1	351	384.89	6.08	29.10	86.87	-0.049	细胞骨架
<i>HD-CsCAD-26</i>	HD.14G0016950.t1	379	407.30	6.78	28.44	86.89	0.063	细胞质
<i>HD-CsCAD-27</i>	HD.06G0024180.t1	386	419.72	5.97	31.21	96.42	0.097	细胞质
<i>HD-CsCAD-28</i>	HD.06G0024190.t1	387	416.77	5.63	32.35	92.61	0.106	细胞质
<i>HD-CsCAD-29</i>	HD.10G0013100.t1	380	415.65	6.43	34.26	85.08	-0.060	细胞质
<i>HD-CsCAD-30</i>	HD.10G0013120.t1	380	415.62	6.43	35.93	84.32	-0.073	细胞质
<i>HD-CsCAD-31</i>	HD.10G0013080.t1	380	414.66	6.86	29.72	85.08	-0.035	细胞质
<i>HD-CsCAD-32</i>	HD.09006357.t1	389	426.84	7.92	33.88	84.40	-0.060	细胞质
<i>HD-CsCAD-33</i>	HD.10G0013070.t1	382	417.42	6.23	32.65	83.14	-0.086	细胞质
<i>HD-CsCAD-34</i>	HD.04G0010500.t1	381	410.63	6.12	43.15	90.03	0.089	叶绿体
<i>HD-CsCAD-35</i>	HD.02G0027290.t1	428	456.90	6.28	26.83	88.53	-0.050	细胞质
<i>HD-CsCAD-36</i>	HD.14G0003760.t1	334	361.32	6.75	24.42	94.49	0.064	细胞质

2.2 茶树 CAD 基因家族系统发育分析

采用 NJ 法构建 CAD 基因家族成员氨基酸序列系统发育树 (图 1), 根据进化关系分析可将茶树和其他物种的 CAD 基因分为 4 个亚家族, 其中, 亚家族 I 中只有 2 个茶树成员, 分别是 *HD-CsCAD-15* 和 *HD-CsCAD-19*, 还包括拟南芥 *AtCAD-4* 和

AtCAD-5、水稻 *OsCAD-2* 和火炬松 *PtaCAD*; 而亚家族 II 中含有 17 个茶树成员, 只有 1 个水稻 *OsCAD-7*; 亚家族 III 中含有 3 个茶树成员, 即 *HD-CsCAD-22*、*23* 和 *HD-CsCAD-25*, 还含有 *AtCAD1*、*OsCAD1* 和 *OsCAD4*; 亚家族 IV 中含有 14 个成员, 还包括了 *AtCAD7*、*AtCAD8* 和 *AtCAD6* 相关。

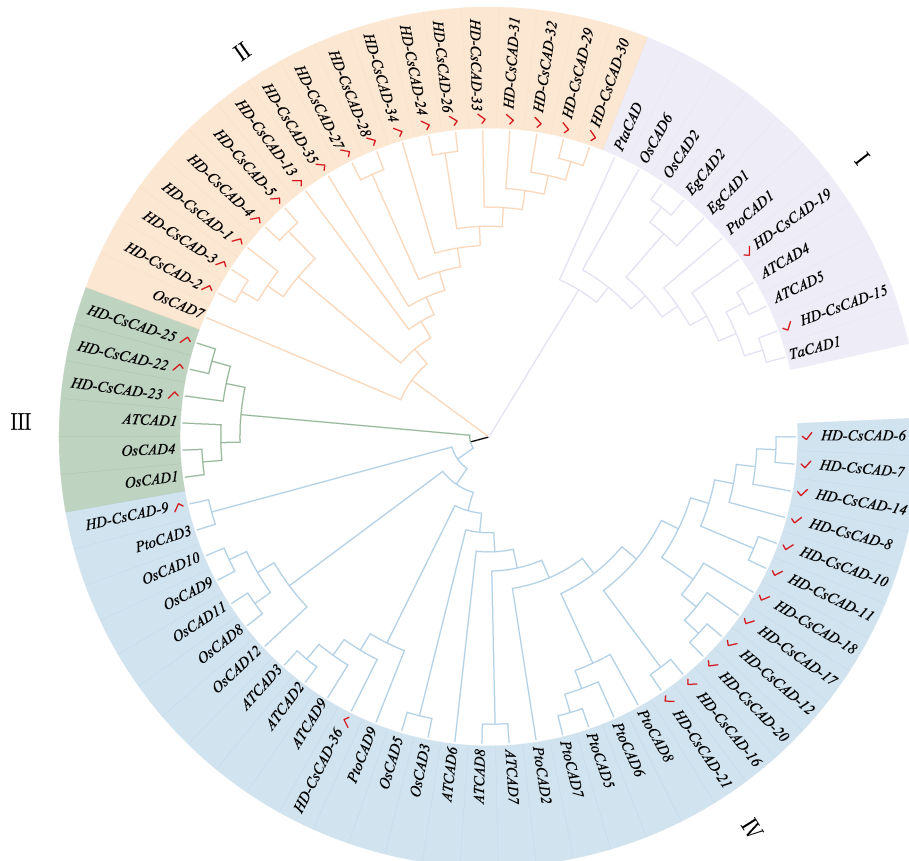


图 1 CAD 基因的系统进化树
Fig. 1 Phylogenetic tree of CAD genes

2.3 茶树 CAD 基因的染色体定位和保守基序分析

36 个茶树 CAD 基因一共存在于 9 条染色体上 (图 2), 其中 Chr07 染色体上存在 8 个成员, Chr02、Chr04 和 Chr09 染色体上分别存在 6 个成员, Chr01 染色体上存在 4 个成员, Chr03 和 Chr12 染色体上分别存在 2 个成员, Chr13 和 Chr11 均只有 1 个成员。

保守基序结果表明 (图 3), 在所有的 *HD-CsCADs* 成员中均检测到 Motif2、Motif3、Motif4、Motif 8 及 Motif 10, 而 Motif 19、Motif 20 只存在于 *HD-CsCAD-1~5* 中。亚家族 I 和亚家族 III、IV 中包含的 Motif 类型相同, 除 *HD-CsCAD-20* 外, 均含有 11 个 motif, 亚家族 II 中除 *HD-CsCAD-*

1~5 和 *HD-CsCAD-13* 外, 其他成员含有的 motif 类型均相同。除 *HD-CsCAD-4*、*HD-CsCAD-5* 和 *HD-CsCAD-30* 基因不含有外显子外, 其余均含有 1~3 个内含子。

2.4 茶树 CAD 基因的启动子顺式作用元件分析

通过分析得到 79 种顺式作用元件 (图 4), 主要包括光反应、生长发育调控、植物激素调控及逆境胁迫响应元件, 其中大多数元件与逆境胁迫响应相关。所有的家族成员中, *HD-CsCAD-27* 含有顺式作用元件种类最多 (33 种), *HD-CsCAD-28* 含有的最少 (14 种)。光反应顺式作用元件中, Box4 几乎存在于所有家族成员中, Gap-box 和 chs-CMA2c 分别只存在于 1 个成员中。

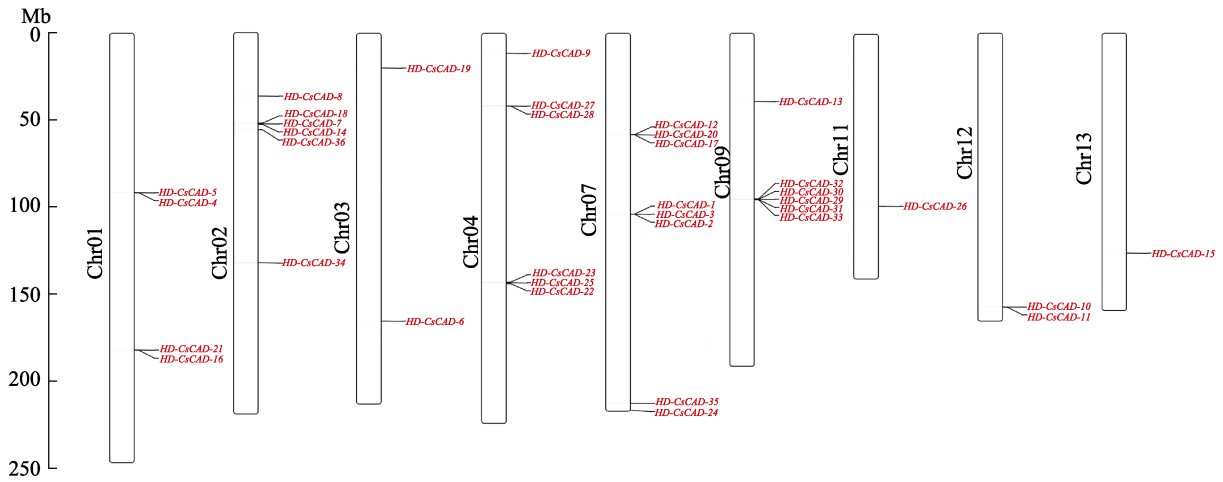


图 2 茶树 CAD 基因染色体分布情况

Fig. 2 Chromosome distribution of CAD genes in tea plants

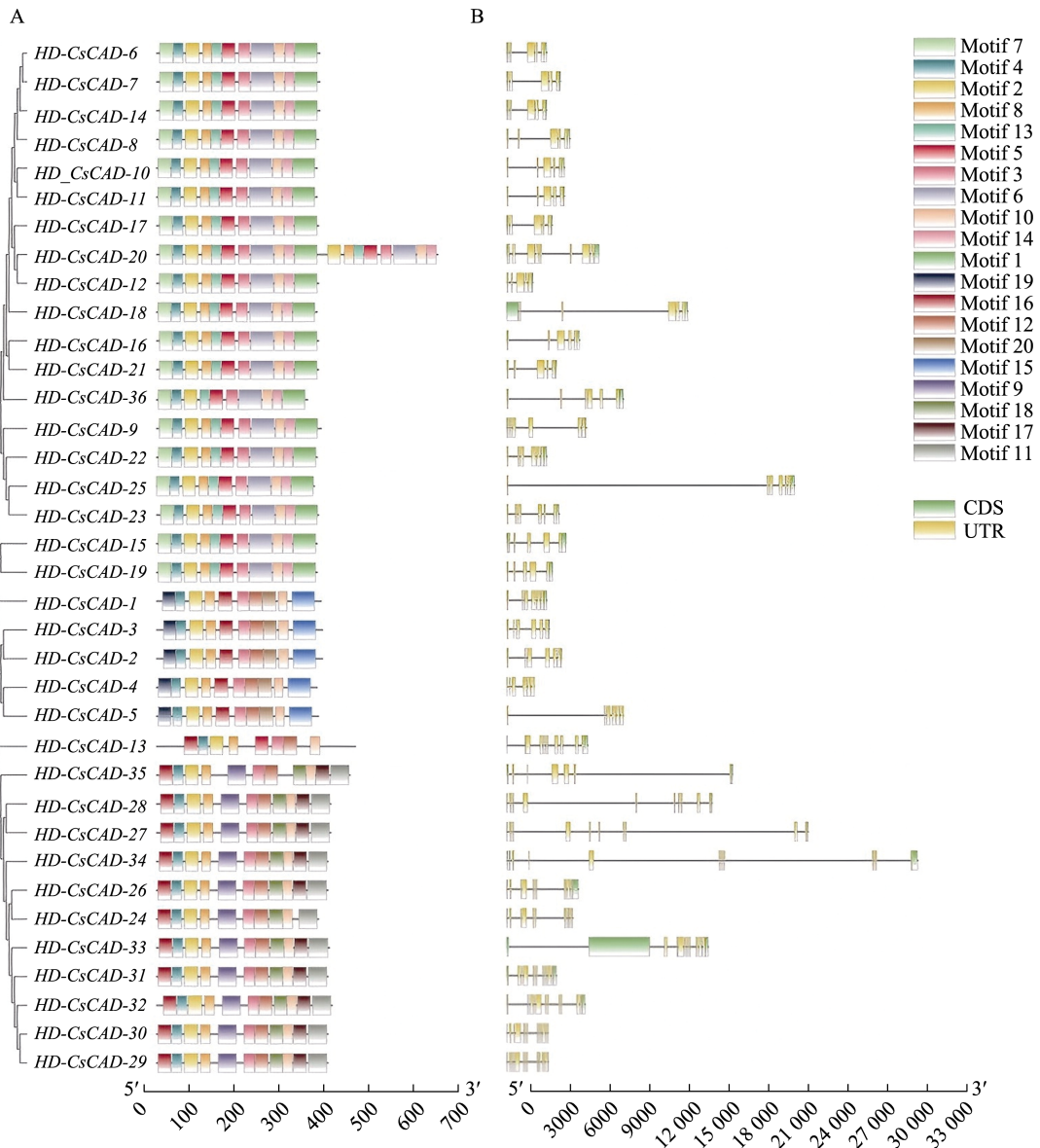


图 3 HD-CsCADs 基因家族的 motif (A) 和基因保守域 (B)

Fig. 3 Motif (A) and gene conserved domain (B) of HD-CsCADs gene family

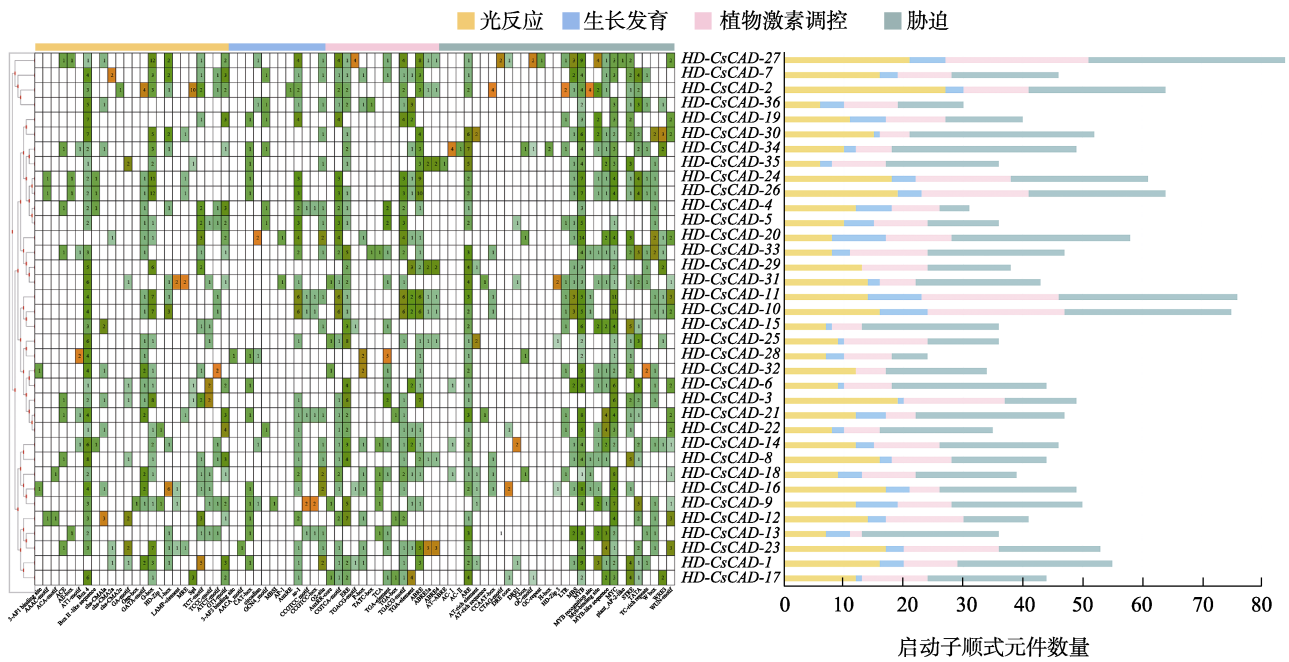


图 4 HD-CsCADs 基因家族的顺式作用元件分析
Fig. 4 Analysis of cis-acting elements in HD-CsCADs gene family

生长发育调控元件中存在 10 种类型, 其中有 2 个家族成员不含有生长发育调控元件, *HD-CsCAD-11* 和 *HD-CsCAD-20* 含有的元件数量最多(9 个), 其中 AACA_motif 只存在于 *HD-CsCAD-23* 中, MBSI 存在于 *HD-CsCAD-9* 中, 19 个家族成员均含有 O2-site 元件。植物激素调控元件有 6 种类型, 即生长素激素、乙烯激素、赤霉素激素、水杨酸激素、茉莉酸激素和脱落酸激素, 其中乙烯激素 ERE 存在于 27 个家族成员中, 26 个家族成员含有 ABRE 响应元件, AuxRE 只存在于 *HD-CsCAD-2* 中, AT~ABRE 只存在于 *HD-CsCAD-35* 中。逆境胁迫响应元件中 *HD-CsCAD-27*、*HD-CsCAD-31* 和 *HD-CsCAD-34* 等含有的元件数量较多, 34 个家族成员含有 MYB, 与木质素相关的顺式作用元件 AC-II 只存在于 *HD-CsCAD-34* 中。

2.5 茶树 CAD 基因家族成员共线性分析

通过茶树物种内的共线性分析(图 5), 发现 CAD 基因家族中只有 1 对共线性基因, 即 *HD-CsCAD-15* 和 *HD-CsCAD-19*。此外, 茶树 CAD 基因家族的成员与拟南芥之间有 6 对同源基因对(图 6), 因此茶树与拟南芥基因组之间也具有明显的共线性关系。

2.6 蛋白互作网络分析

在拟南芥中, 使用 STRING 网站进行了

HD-CAD 基因编码蛋白相互作用网络, 重点是 PER、ADH 和 CAD 之间的相互作用。在蛋白质互作图谱中(图 7), *HD-CsCAD-15*、*HD-CsCAD-19* 和 *HD-CsCAD-1~HD-CsCAD-5* 基因的编码蛋白连接性最高。

2.7 茶树 CAD 基因特异性表达分析

基于转录组数据分析 *HD-CsCADs* 在芽、嫩叶、茎、老叶和根中的表达模式(图 8), 发现 *HD-CsCAD-15* 和 *HD-CsCAD-26* 在 5 个器官中均高表达。*HD-CsCAD-13*、*HD-CsCAD-7* 主要在根中表达; *HD-CsCAD-11* 和 *HD-CsCAD-36* 主要在芽、嫩叶和茎中表达。上述表明, *HD-CsCAD* 不同基因在不同部位的表达程度有明显差异, 可能在不同的组织中发挥不同作用。

2.8 茶树 CAD 基因在不同处理下的表达情况

从转录组的数据中选取在茎中表达量较高的 6 个基因, 在未处理(CK)、叶蝉取食(CH)、机械损伤(MD)、机械损伤+唾液蛋白(SM)和唾液处理(SD)处理后的 12、24、48 h 之内的表达量进行分析。根据相对表达情况(图 9)可知, 与健康组相比, 叶蝉取食特异性诱导了 *HD-CsCAD-3* 和 *HD-CsCAD-15* 基因的持续上调表达, 其表达量在 48 h 达到峰值, 而 *HD-CsCAD-19* 和 *HD-CsCAD-26* 则呈现下降表达的趋势。

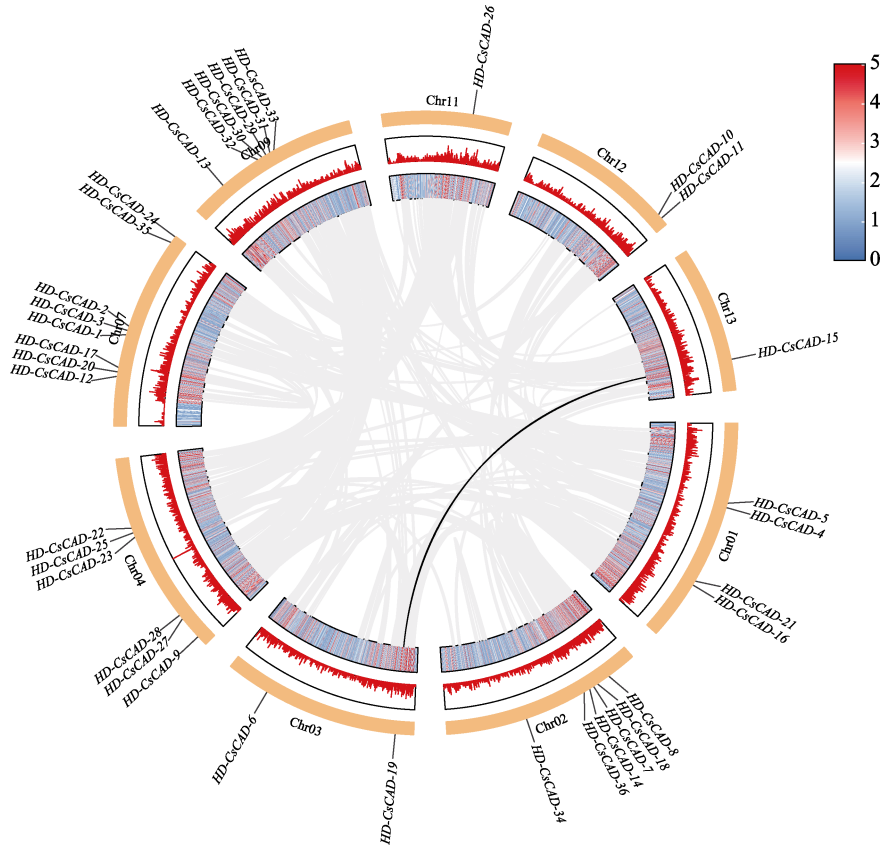


图 5 茶树 CAD 物种内的共线性分析

Fig. 5 Co-linearity analysis within CAD species of tea plants

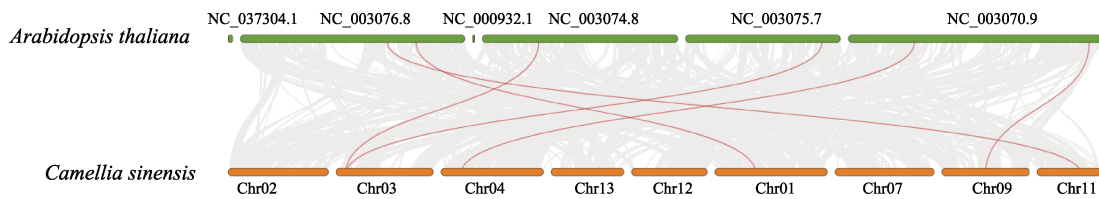


图 6 拟南芥和茶树 CAD 基因种间共线性

Fig. 6 Interspecific collinearity of CAD genes between *A. thaliana* and *C. sinensis*

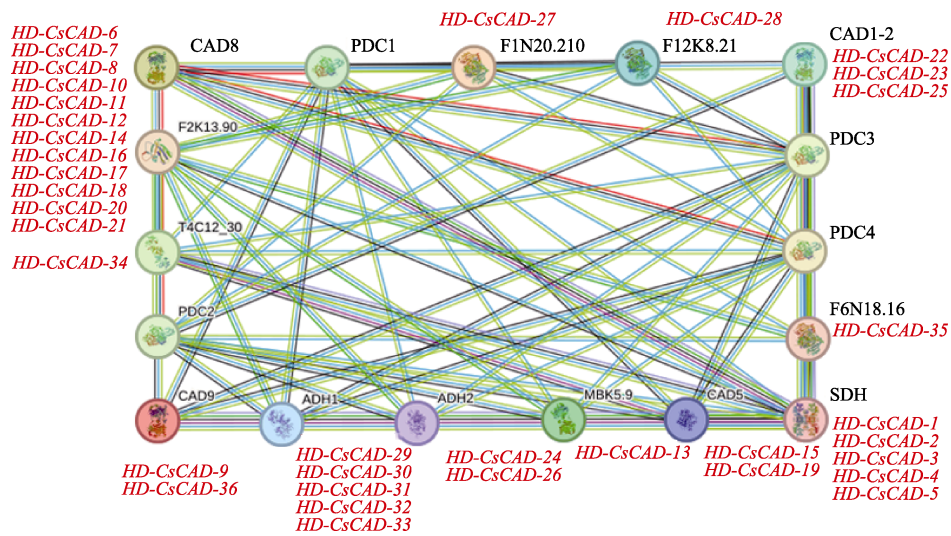


图 7 茶树 CAD 蛋白相互作用网络分析

Fig. 7 Analysis of CAD protein interaction network in tea plants

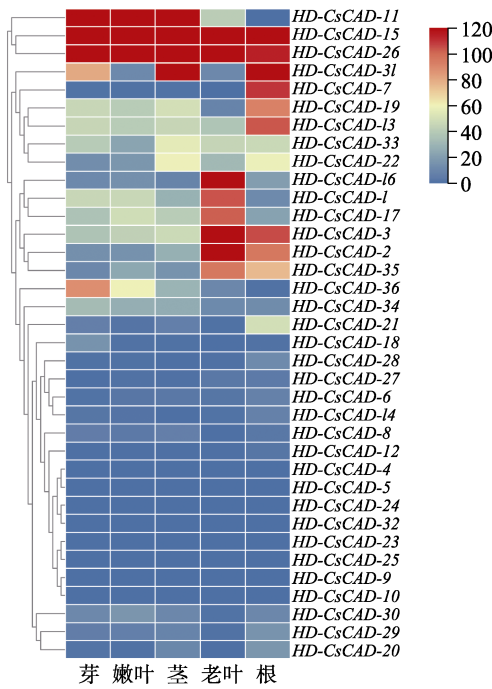


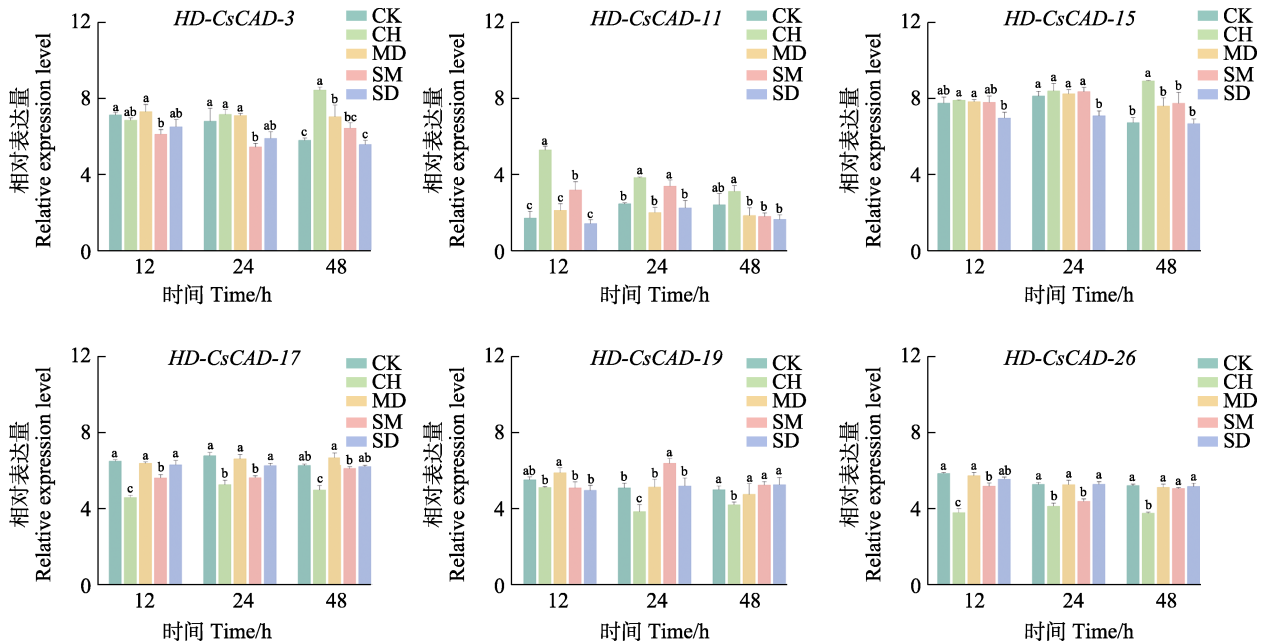
图 8 HD-CsCADs 在茶树不同组织部位的表达模式
Fig. 8 Expression patterns of HD-CsCADs in different tissue parts of tea plants

在机械损伤处理中, HD-CsCAD-19 呈下降表达的趋势, 在 12 h 达到峰值。在机械损伤和唾液蛋白处理下, HD-CsCAD-11、HD-CsCAD-15、HD-CsCAD-19 均呈先上升后下降的趋势, 且在 24h 达到峰值, HD-CsCAD-3、HD-CsCAD-17、HD-CsC

AD-26 呈先下降后上升的趋势。在唾液处理组中, HD-CsCAD-3 呈下降表达趋势。

3 讨论

木质素的形成是通过苯丙烷代谢途径实现的^[8], 这一过程需要多种酶的协同作用。其中, CAD 起到至关重要的作用, 负责催化整个合成代谢途径中的最后一步反应^[18]。于 1992 年, CAD 基因从烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 的茎部分离获得^[28], 后来又从火炬松中分离获得^[29]。目前 CAD 基因已在多个植物中被鉴定出来。本研究共鉴定到 36 个 CAD 基因。有研究表明, 根据系统发育分析可将 CAD 基因家族分为 3 大类, 其中第一类被认为是真正的 CAD^[30]。本研究将鉴定到的茶树中的 36 个 CAD 基因和其他物种的 CAD 基因分为 4 个亚家族, 聚类在亚家族 I 的 CAD 成员, 在多种植物中已被证实对木质素的生物合成起主要作用^[31], 如水稻中的 *OsCAD-2*、拟南芥中的 *AtCAD4* 和 *AtCAD5*、小麦中的 *TaCAD1* 和火炬松 *PtaCAD*, 被认为与木质素生物合成有关。它们优先在活跃的木质化组织中表达^[32], 主要参与松柏醇和新树醇的合成^[33]。茶树中的 *HD-CsCAD-15* 和 *HD-CsCAD-19* 也归属这一亚家族, 这意味着 *HD-CsCAD-15* 和 *HD-CsCAD-19* 也可能参与木质素生物合成。第二类和第三类的 CAD 主要在木质



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 9 茶树 CAD 基因在不同处理下的表达情况
Fig. 9 Relative expression level of CAD genes in tea plants under different treatments

素中表达,可能在植物逆境调控或生长发育等其他方面具有功能^[18]。亚家族 II 只有 1 个水稻 *OsCAD-7*,研究发现,水稻中 *OsCAD-7* 与 *LpCAD2* 的表达模式相似^[10],然而, *LpCAD2* 蛋白质序列是独特的,并且具有叶绿体信号肽和独特的底物结合位点。研究认为 *LpCAD2* 是一个失去功能的基因^[34],因此推测亚家族 II 中茶树的 CAD 基因家族成员也失去功能。亚家族 III 中只有 3 个茶树 CAD 基因家族成员,还含有 *AtCAD1*、*OsCAD1* 和 *OsCAD4*。在拟南芥中, *AtCAD1* 对木质素合成的催化活性不高^[11]。因此这 3 个基因是否催化木质素合成还未确定。亚家族 IV 中含有 14 个茶树 CAD 基因家族成员,还包括 *AtCAD7*、*AtCAD8* 和 *AtCAD9*。在拟南芥中, *AtCAD7* 和 *AtCAD8* 与植物抗性相关^[11]。因此,我们假设 IV 家族的大多数基因成员参与茶树抗性,参与茶树防御机制或作为功能冗余的 CAD 基因发挥作用^[35]。

在基因复制事件中,如果 2 个同源基因之间间隔的基因数不超过 5 个,则认为它们是串联重复基因;如果间隔基因数量超过 5 个或分布于不同的染色体上,则认为它们是节段性重复^[36]。在茶树中只发现了 1 对基因复制,即 *HD-CsCAD-15* 和 *HD-CsCAD-19*,因此可能是由于节段性重复而形成的。

启动子中含有 79 种顺式作用元件,其中逆境胁迫响应的元件含量最多,说明茶树 CAD 家族成员在植物的逆境胁迫中发挥着重要作用。在组织特异性表达分析中, *HD-CsCAD-15* 基因在茶树的茎部呈高表达,这表明该基因可能特异性参与茶树茎秆木质化的生物合成过程。

结合转录组数据分析发现, CAD 基因的表达调控受到生物和非生物胁迫的影响,叶蝉取食后, *HD-CsCAD-3*、*HD-CsCAD-11* 和 *HD-CsCAD-15* 均随着时间表现出明显变化。尤其是 *HD-CsCAD-11* 在 12 h 时表达最高,而 *HD-CsCAD-17*、*HD-CsCAD-19* 和 *HD-CsCAD-26* 的表达量均低于 CK 组。在机械损伤后, *HD-CsCAD-17* 和 *HD-CsCAD-26* 的表达量随着时间和 CK 组表达量的变化趋势相同,表明 *HD-CsCAD-17* 和 *HD-CsCAD-26* 在茎和老叶中表达量高与叶蝉取食和机械损伤无关。只有 *HD-CsCAD-3* 和 *HD-CsCAD-15* 是呈上升趋势。当植物在受到叶蝉取食或机械损伤等外界胁迫时,可能激发细胞壁木质化沉积的防御应答机制,进而提升植株的抗病和抗逆性^[9, 21]。综上所述,叶

蝉取食和机械损伤处理均能诱导茶树 CAD 基因不同程度的表达。结合茶树不同组织及叶蝉胁迫处理下的表达模式分析,虫害胁迫显著诱导部分 *HD-CsCADs* 基因表达上调,可能通过调控木质素合成增强茶树机械防御能力。其中 *HD-CsCAD-11* 和 *HD-CsCAD-15* 基因的表达较明显,这 2 个基因可能通过调控木质素生物合成参与茶树抗虫防御反应,可作为分析茶树-昆虫互作机制的关键候选基因。本研究为茶树抗虫分子机制解析及后续开展 CAD 基因功能验证提供理论依据。

参考文献

- [1] WEI C L, YANG H, WANG S B, ZHAO J, LIU C, GAO L P, XIA E H, LU Y, TAI Y L, SHE G B, SUN J, CAO H S, TONG W, GAO Q, LI Y Y, DENG W W, JIANG X L, WANG W Z, CHEN Q, ZHANG S H, LI H J, WU J L, WANG P, LI P H, SHI C Y, ZHENG F Y, JIAN J B, HUANG B, SHAN D, SHI M M, FANG C B, YUE Y, LI F D, LI D X, WEI S, HAN B, JIANG C J, YIN Y, XIA T, ZHANG Z Z, BENNETZEN J L, ZHAO S C, WAN X C. Draft genome sequence of *Camellia sinensis* var. *sinensis* provides insights into the evolution of the tea genome and tea quality[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(18): E4151-E4158.
- [2] MEEGAHAKUMBURA M K, WAMBULWA M C, LI M M, THAPA K K, SUN Y S, MICHAEL M L, XUN J C, YANG J B, LIU J, LIU B Y, LI D Z, GAO L M. Domestication origin and breeding history of the tea plant (*Camellia sinensis*) in China and India based on nuclear microsatellites and cpDNA sequence data[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 2270.
- [3] CHATURVEDULA V S P, PRAKASH I. The aroma, taste, color and bioactive constituents of tea[J]. Academic Journals, 2011, 8: 2270.
- [4] 罗晨. “三茶”统筹为全球茶产业可持续发展贡献中国经验[N]. 中国食品报, 2024-04-19(001).
LUO C. Coordinated development of the “three tea initiatives” contributes Chinese experience to global tea industry sustainability[N]. China Food News, 2024-04-19(001). (in Chinese)
- [5] XIA E H, ZHANG H B, SHENG J, LI K, ZHANG Q J, KIM C, ZHANG Y, LIU Y, ZHU T, LI W, HUANG H, TONG Y, NAN H, SHI C, SHI C, JIANG J J, MAO S Y, JIAO J Y, ZHANG D, ZHAO Y, ZHAO Y J, ZHANG L P, LIU Y L, LIU B Y, YU Y, SHAO S F, NI D J, EICHLER E E, GAO L Z. The tea tree genome provides insights into tea flavor and

- independent evolution of caffeine biosynthesis[J]. *Molecular Plant*, 2017, 10(6): 866-877.
- [6] BATTLE M, BENDER M L, TANS P P, WHITE J W, ELLIS J T, CONWAY T, FRANCEY R J. Global carbon sinks and their variability inferred from atmospheric O₂ and δ¹³C[J]. *Science*, 2000, 287(5462): 2467-2470.
- [7] 曹佳强, 李波, 杨洋, 胡文冉, 王玉晶, 范玲. 木质素生物合成中肉桂醇脱氢酶基因(CAD)的研究进展[J]. *分子植物育种*, 2014, 12(5): 1034-1043.
CAO J Q, LI B, YANG Y, HU W R, WANG Y J, FAN L. Advanced progress in the cinnamyl alcohol dehydrogenase gene involved in lignin biosynthesis[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2014, 12(5): 1034-1043. (in Chinese)
- [8] VANHOLME R, DE MEESTER B, RALPH J, BOERJAN W. Lignin biosynthesis and its integration into metabolism[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019, 56: 230-239.
- [9] DIXON R A, LAMB C J, MASOUD S, SEWALT V J, PAIVA N L. Metabolic engineering: prospects for crop improvement through the genetic manipulation of phenylpropanoid biosynthesis and defense responses: a review[J]. *Gene*, 1996, 179(1): 61-71.
- [10] TOBIAS C M, CHOW E K. Structure of the cinnamyl-alcohol dehydrogenase gene family in rice and promoter activity of a member associated with lignification[J]. *Planta*, 2005, 220(5): 678-688.
- [11] SIBOUT R, EUDES A, POLLET B, GOUJON T, MILA I, GRANIER F, SEGUIN A, LAPIERRE C, JOUANIN L. Expression pattern of two paralogs encoding cinnamyl alcohol dehydrogenases in *Arabidopsis* isolation and characterization of the corresponding mutants[J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(2): 848-860.
- [12] 任晓庆, 王波, 欧阳春平, 丁鑫炎, 樊洁晶, 高建华. 谷子 CAD 基因家族的鉴定及分析[J]. *山西农业科学*, 2022, 50(3): 289-295.
REN X Q, WANG B, OUYANG C P, DING X Y, FAN J J, GAO J H. Identification and analysis of CAD gene family in foxtail millet[J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2022, 50(3): 289-295. (in Chinese)
- [13] PERACCHI L M, BREW-APPIAH R A T, GARLAND-CAMPBELL K, ROALSON E H, SANGUINET K A. Genome-wide characterization and expression analysis of the CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE gene family in *Triticum aestivum*[J]. *BMC Genomics*, 2024, 25(1): 816.
- [14] SABALLOS A, EJETA G, SANCHEZ E, KANG C, VERMERRIS W. A genomewide analysis of the cinnamyl alcohol dehydrogenase family in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] identifies *SbCAD2* as the brown midrib6 gene[J]. *Genetics*, 2009, 181(2): 783-795.
- [15] LI M T, CHENG C X, ZHANG X F, ZHOU S P, LI L X, YANG S L. Overexpression of pear (*Pyrus pyrifolia*) *CAD2* in tomato affects lignin content[J]. *Molecules*, 2019, 24(14): 2595.
- [16] PARK H L, KIM T L, BHOO S H, LEE T H, LEE S, CHO M. Biochemical characterization of the rice cinnamyl alcohol dehydrogenase gene family[J]. *Molecules*, 2018, 23(10): 2659.
- [17] WEI R, LUO M Y, SHAN T L, WEI X N, DU L P, XU H J, ZHANG Z Y. A wheat cinnamyl alcohol dehydrogenase *TaCAD12* contributes to host resistance to the sharp eyespot disease[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1723.
- [18] 张鲁斌, 谷会, 弓德强, 常金梅. 植物肉桂醇脱氢酶及其基因研究进展[J]. *西北植物学报*, 2011, 31(1): 204-211.
ZHANG L B, GU H, GONG D Q, CHANG J M. Research progress of cinnamyl alcohol dehydrogenase and its gene[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2011, 31(1): 204-211. (in Chinese)
- [19] 曾珊珊, 高婷, 谷梦雅, 侯炳豪, 任卫威, 张宇航, 叶乃兴. 基于黄桉 (*Camellia sinensis*) 基因组的 DXS 基因家族鉴定及表达[J]. *应用与环境生物学报*, 2024, 30(4): 811-817.
ZENG S S, GAO T, GU M Y, HOU B H, REN W W, ZHANG Y H, YE N X. Genome-wide identification and expression of the DXS gene family in Huangdan (*Camellia sinensis*) [J]. *Journal of Applied & Environmental Biology*, 2024, 30(4): 811-817. (in Chinese)
- [20] DENG W W, ZHANG M, WU J Q, JIANG Z Z, TANG L, LI Y Y, WEI C L, JIANG C J, WAN X C. Molecular cloning, functional analysis of three cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) genes in the leaves of tea plant, *Camellia sinensis* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2013, 170(3): 272-282.
- [21] 张明. 茶树中三个与茶尺蠖取食诱导相关的肉桂醇脱氢酶 (CAD) 基因克隆与功能分析[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2011.
ZHANG M. Molecular cloning, functional analysis of three cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) genes in relation to *Ectopica obliqua* induction in the leaves of *Camellia sinensis* [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2011. (in Chinese)
- [22] 庄明珠, 李代胜, 涂育东, 李鹏春, 闫佳伟, 何春梅, 陈美霞, 金珊. 不同茶树品种制作美人茶的品质评价[J]. *热带作物学报*, 2022, 43(5): 1076-1084.
ZHUANG M Z, LI D S, TU Y D, LI P C, YAN J W, HE C M, CHEN M X, JIN S. Quality evaluation of beauty tea produced by different tea tree varieties[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2022, 43(5): 1076-1084. (in Chinese)
- [23] WANG P J, YU J X, JIN S, CHEN S, YUE C, WAN G W L, GAO S L, CAO H L, ZHENG Y C, GU M

- Y, CHEN X J, SUN Y, GUO Y Q, YANG J F, ZHAN G X T, YE N X. Genetic basis of high aroma and stress tolerance in the oolong tea cultivar genome[J]. Horticulture Research, 2021, 8(1): 107.
- [24] CHAO N, LIU S X, LIU B M, LI N, JIANG X N, GAI Y. Molecular cloning and functional analysis of nine cinnamyl alcohol dehydrogenase family members in *Populus tomentosa*[J]. Planta, 2014, 240(5): 1097-1112.
- [25] O'MALLEY D M, PORTER S, SEDEROFF R R. Purification, characterization, and cloning of cinnamyl alcohol dehydrogenase in loblolly pine (*Pinus taeda* L.)[J]. Plant Physiology, 1992, 98(4): 1364-1371.
- [26] 闫佳伟, 陈宗懋, 李兆群, 罗宗秀, 边磊, 蔡晓明, 金珊. 小贯小绿叶蝉水状唾液蛋白的鉴定及其参与茶树“叶蝉烧”症状形成的初步研究[J]. 茶叶科学, 2023, 43(1): 40-54.
- YAN J W, CHEN Z M, LI Z Q, LUO Z X, BIAN L, CAI X M, JIN S. Identification of watery saliva protein from *Empoasca onukii* and preliminary study on the involvement in the formation of “Hopperburn” symptoms in tea plants[J]. Journal of Tea Science, 2023, 43(1): 40-54. (in Chinese)
- [27] YUSUF C Y L, NABILAH N S, TAUFIK N A A M, SEMAN I A, ABDULLAH M P. Genome-wide analysis of the CAD gene family reveals two bona fide CAD genes in oil palm[J]. 3 Biotech, 2022, 12(7): 149.
- [28] JIN S, CHEN Z M, BACKUS E A, SUN X. Characterization of EPG waveforms for the tea green leafhopper, *Empoasca vitis* Göthe (Hemiptera: Cicadellidae), on tea plants and their correlation with stylet activities[J]. Journal of Insect Physiology, 2012, 58(9): 1235-1244.
- [29] SIBOUT R, EUDES A, MOUILLE G, POLLET B, LAPIERRE C, JOUANIN L, SE GUIN A. Cinnamyl alcohol dehydrogenase-C and-D are the primary genes involved in lignin biosynthesis in the floral stem of *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2005, 17(7): 2059-2076.
- [30] RAES J, ROHDE A, CHRISTENSEN J H, VAN DE PEER Y, BOERJAN W. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2003, 133(3): 1051-1071.
- [31] 王永鑫. 茶树木质素代谢分子机制研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2019.
- WANG Y X. Study of molecular mechanism of lignin metabolism in tea plant (*Camellia sinensis*)[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2019. (in Chinese)
- [32] HIRANO K, AYA K, KONDO M, OKUNO A, MORINAKA Y, MATSUOKA M. *OsCAD2* is the major CAD gene responsible for monolignol biosynthesis in rice culm[J]. Plant Cell Reports, 2012, 31(1): 91-101.
- [33] KIM S, KIM M, BEDGAR D L, MOINUDDIN S G A, CARDENAS C L, DAVIN L B, KANG C, LEWIS N G. Functional reclassification of the putative cinnamyl alcohol dehydrogenase multigene family in *Arabidopsis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(6): 1455-1460.
- [34] VAN PARIJS F R D, RUTTINK T, BOERJAN W, HAESAERT G, BYRNE S L, ASP T, ROLDAN-RUIZ I, MUYLLE H. Clade classification of monolignol biosynthesis gene family members reveals target genes to decrease lignin in *Lolium perenne*[J]. Plant Biology, 2015, 17(4): 877-892.
- [35] BARAKAT A, BAGNIEWSKA-ZADWORNIA A, CHOI A, PLAKKAT U, DILORETO D S, YELLANKI P, CARLSON J E. The cinnamyl alcohol dehydrogenase gene family in *Populus*: phylogeny, organization, and expression[J]. BMC Plant Biology, 2009, 9: 26.
- [36] WANG H M, LI Y, GUO Z Q, ZHOU X K, ZHAO Y X, HAN Y C, LIN X H. Genome-wide identification of AAAP gene family and expression analysis in response to saline-alkali stress in foxtail millet (*Setaria italica* L.)[J]. Scientific Reports, 2024, 14(1): 3106.