

牡丹响应高温胁迫的转录组分析及 *PsHSP* 基因表达

郝力慧^{1,2,3}, 董彬^{1,2,3}, 朱绍华^{1,2,3}, 马进^{1,2,3}

(1. 浙江农林大学 浙江省园林植物种质创新与利用重点实验室, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江农林大学 南方园林植物种质创新与利用国家林业和草原局重点实验室, 浙江 杭州 311300; 3. 浙江农林大学 风景园林与建筑学院, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】夏季高温可导致牡丹 *Paeonia suffruticosa* 生长受限, 花期缩短, 观赏品质降低。研究牡丹耐热基因对牡丹热胁迫的分子机制。【方法】以牡丹品种‘羽红’‘Yuhong’为材料, 对高温 (40 °C) 和对照 (25 °C) 处理后的叶片进行转录组测序, 分析响应高温表达的差异基因; 同时利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 验证差异基因, 并对热激蛋白基因 HSPs 进行时空表达分析。【结果】测序共获得 45.97 Gb 数据, 与对照组 (25 °C) 相比, 高温处理后 4 220 个基因上调表达, 3 453 个基因下调表达。通过基因本体 (GO) 分析发现, 这些差异基因主要富集于代谢等生物学过程、细胞和膜结构等细胞成分以及结合和催化活性等分子功能条目; 另外, 通过全基因组及代谢途径数据库 (KEGG) 分析发现, 碳代谢途径的差异基因数量最多。对牡丹热激蛋白 *PsHSP* 基因定量分析发现, *PsHSP* 基因随着高温处理时间呈上升表达趋势, 24 h 达到最高, 之后便呈现下降趋势。【结论】高温显著影响牡丹的代谢和生物合成等过程, 进而影响牡丹的生长和发育。*PsHSP* 基因可在短期内迅速响应高温胁迫并参与牡丹的耐热调控。图 4 表 6 参 34

关键词: 植物学; 牡丹; 高温胁迫; 转录组; 热激蛋白

中图分类号: Q943 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2021)04-0802-10

Transcriptome analysis and *PsHSP* gene expression of *Paeonia suffruticosa* in response to high temperature stress

HAO Lihui^{1,2,3}, DONG Bin^{1,2,3}, ZHU Shaohua^{1,2,3}, MA Jin^{1,2,3}

(1. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Germplasm Innovation and Utilization for Garden Plants, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration on Germplasm Innovation and Utilization for Southern Garden Plants, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 3. College of Landscape Architecture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] High temperature in summer can lead to growth restriction, shorter flowering period and lower ornamental quality of *Paeonia suffruticosa*. This study aims to explore the molecular mechanism of heat stress induced by heat tolerance genes in *P. suffruticosa*. [Method] Using *P. suffruticosa* ‘Yuhong’ as material, transcriptome sequencing of leaves treated with high temperature (40 °C) and room temperature (25 °C) was conducted to analyze the differentially expressed genes in response to high temperature. Meanwhile, the differential genes were verified by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR), and the spatio-temporal expression of heat shock protein gene HSPs was analyzed. [Result] A total of 45.97 Gb data were obtained by sequencing. Compared with the control group (25 °C), 4 220 genes were up-regulated and 3 453 genes were down-regulated after high temperature treatment. Through gene ontology (GO) analysis, it was found that these

收稿日期: 2020-08-18; 修回日期: 2021-03-11

基金项目: 浙江农林大学科研发展基金资助项目 (2017FR016); 元成环境股份企业研发项目 (201801)

作者简介: 郝力慧 (ORCID: 0000-0002-7687-5933), 从事园林植物遗传育种研究。E-mail: 2018105252002@stu.zafu.edu.cn。通信作者: 马进 (ORCID: 0000-0003-0534-5836), 副教授, 从事园林植物遗传育种及抗性研究。E-mail: majinzjl@163.com

differential genes were mainly concentrated in biological processes such as metabolism, cellular components such as cell and membrane structure, and molecular functional items such as binding and catalytic activity. In addition, genome-wide and metabolic pathway database (KEGG) analysis showed that the number of differential genes in carbon metabolic pathway was the largest. Quantitative analysis of heat shock protein *PsHSP* gene showed that the expression of *PsHSP* gene increased with the time of high temperature treatment, reached the peak at 24 h, and then showed a downward trend. [Conclusion] High temperature significantly affects the metabolism and synthesis of *P. suffruticosa*, and further affects its growth and development. *PsHSP* gene can rapidly respond to high temperature stress in a short time and participate in heat tolerance regulation in *P. suffruticosa*. [Ch, 4 fig. 6 tab. 34 ref.]

Key words: botany; *Paeonia suffruticosa*; heat stress; transcriptome; heat shock protein

全球变暖导致植物在生长发育和环境适应性等方面面临更加多样化的挑战^[1]。高温不仅影响植物表型变化,而且会引起植物体内细胞稳态失衡,生长和发育受到抑制,严重影响观赏植物的品质和产量^[2-3]。如芍药 *Paeonia lactiflora* 在遭受高温胁迫后,植株出现萎蔫、畸形、变色等热害现象,甚至全株死亡^[4]。在牡丹 *P. suffruticosa* 中也出现类似的表型现象^[5]。另外,经过高温处理后,牡丹和月季 *Rosa chinensis* 植株内的脯氨酸、丙二醛、可溶性糖以及相对细胞膜透性显著升高,而净光合速率、超氧化物歧化酶和可溶性蛋白质含量等显著降低^[6-8]。为了深入了解高温胁迫对观赏植物品质的影响,利用现代分子生物学以及转录组学等手段^[9],挖掘关键基因并解析其调控耐热的分子机制,是培育和开发耐热优良品种的重要途径。对非洲菊 *Gerbera jamesonii* 切花高温处理后,转录组分析发现大部分单基因簇(unigene)可注释到细胞过程、代谢过程和结合功能等基因本体(GO)过程中^[10];全基因组及代谢途径数据库(KEGG)中代谢功能途径中的单基因簇分布最多。在柳枝稷 *Panicum virgatum* 中发现^[11]:长期高温胁迫条件下大量的基因发生差异表达,其中与 ATP 酶调节因子、伴侣结合和蛋白质折叠相关的基因显著上调,与蛋白质修饰、转录、磷和氮代谢途径相关的基因在热胁迫后显著下调。热激蛋白(heat shock protein, HSPs)是一类高温胁迫诱导的主要功能蛋白,其分子量为 10~200 kDa,包括 HSP60、HSP70、HSP90、HSP100 和小分子量热激蛋白^[12](small heat shock protein, sHSP)等 5 类。HSPs 充当蛋白质质量控制的分子伴侣,作为分子伴侣和折叠催化剂细胞网络的中心成分,在热应激中被诱导并参与热应激过程中的信号转导^[13];sHSP 存在多数植物叶肉细胞中,在外界热诱导条件下的 sHSP 表达呈现上升的趋势^[14-16]。在女娄 *Clematis apiifolia*^[17] 中,高温处理后热激蛋白热胁迫后明显上调,而且 sHSPs 是对热胁迫反应最强烈的伴侣基因家族。HSPs 不仅响应高温变化,还对水分、盐渗透和氧化胁迫等^[12, 14]有响应。牡丹是芍药科 Paeoniaceae 芍药属 *Paeonia* 多年生落叶灌木,中国传统名花^[18]。目前,关于牡丹基因的研究多集中于生长发育、花色基因挖掘以及抗氧化活性物质生物合成等方面^[19-22],相关耐热研究报道较少。牡丹对高温较为敏感,夏季高温严重制约牡丹的生长和发育,致使花期缩短,观赏品质降低,因此,挖掘牡丹耐热基因对牡丹热胁迫分子机制探究,以及牡丹育种和推广具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 植物材料

实验材料牡丹‘羽红’*P. suffruticosa* ‘Yuhong’保存在浙江农林大学智能实验大棚。取长势一致的 1 年生幼苗移栽至花盆缓苗,1 株·盆⁻¹,正常管理。后转移至人工气候箱中,在温度 25 ℃,光 12 h/暗 12 h,光强 4 000 lx,湿度 80% 条件下预培养 2 周。处理组和对照组分别置于 40 和 25 ℃ 人工气候箱中处理 24 h,选取相同位置的叶片,使用液氮速冻并保存于-80 ℃ 冰箱于后期备用,设置 3 个生物学重复。

1.2 叶片总 RNA 提取及 cDNA 文库构建

使用 Trizol 试剂盒(天根,北京)提取牡丹叶片总 RNA,按照说明书操作。用紫外分光光度计和质量分数 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检查 RNA 质量,质量检测合格后,经百迈客生物科技有限公司(北京)使用 Illumina HiSeq²⁵⁰⁰ 对 6 个独立样品进行双端文库构建以及 RNA-Seq 测序。

1.3 转录组测序及数据分析

将测序获得的原始序列读长 (raw data) 进行过滤组装, 得到高质量的有效序列读长 (clean reads), 然后使用 Trinity 进行序列组装^[23-24]。所得单基因簇序列用基于 BLAST 算法的搜索和注释, 对照非冗余蛋白质 (Nr) 数据库 (www.ncbi.nlm.nih.gov/)、全基因组及代谢途径 (KEGG) 数据库 (www.genome.jp/kegg/kaas/)、蛋白直系同源簇 (COG) 数据库 (www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/) 以及瑞士蛋白质序列及注解 (Swissprot) 数据库 (www.expasy.ch/SPORT) 等数据库进行注释。使用 Blast2Go 软件 (www.blast2go.com/) 进行基因本体论 (GO) 功能分析。

1.4 基因表达量及差异基因分析

使用 Bowtie 软件将测序所得的片段与非冗余基因序列库进行对比, 结合 RSEM(RNA-Seq by Expectation-Maximization) 预估表达量水平^[24-25]。在此基础上分析高温胁迫处理前后 6 组样本的差异表达基因, 使用 RPKM[每百万序列读长 (Reads) 中某基因每千长度序列读长值] 统计基因的表达量; 单基因簇表达丰度用 FPKM 值表示, 以差异倍数 $|\log_2 A| \geq 2$ 。其中, A 表示差异倍数或变化倍数 (fold change), 且错误发现率 (false discovery rate) ≤ 0.01 为标准筛选差异表达基因。

1.5 实时荧光定量 PCR

使用 Primer Premier 5.0 软件设计荧光定量 PCR 引物 (表 1), Prime Script RT reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒 (TaKaRa, 北京) 进行实时荧光定量 PCR 反应。反应体系: 上下游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 $0.4 \mu\text{L}$, cDNA $1.0 \mu\text{L}$, ddH₂O $3.2 \mu\text{L}$, SYBR Premix Ex Taq $5.0 \mu\text{L}$ 。总反应程序: 95°C 预变性 30 s , 95°C 变性 5 s , 60°C 复性 30 s , 共 38 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[26-28] 计算目的基因相对表达量, 其中以牡丹泛素延伸蛋白基因 (Ubiquitin) 为内参基因^[29], 设 3 次生物学重复。

表 1 实时荧光定量基因引物信息

Table 1 Real-time fluorescence quantitative gene primer information

基因编号	基因名称	引物序列(5'→3')	退火温度/ $^\circ\text{C}$
C65824.graph_c0	<i>PsHSP70</i>	GCAGCCGTTTCAGGCAGCAA ACACCGCCAGCAGTTTCG	58.3
C114411.graph_c0	<i>Ps4CL1</i>	AGGCTATGCTACTCACGC TCATCCTCGGCAATCTG	53.5
C106006.graph_c0	<i>PsCAT5</i>	GAGTGTTGCGTTAATAGGCG GCACTTGACAGGGAAGGTAT	56.5
C111201.graph_c0	<i>PsCHL1</i>	GAGTGCTGAGATTTTAAGTGGC CAACCCTTTCTACCTGACGA	56.7
C120725.graph_c0	<i>PsAMP1</i>	ATTGTACGGCAGAACAGGC GTGTAGCTCAGAACCCATTAGAC	55.3
C112526.graph_c0	<i>PsSAMDC</i>	GTCCAGGCGAATGTTCTAATG GTCGAAGGTCTTCAATGCTG	56.7
C119988.graph_c0	<i>PsRPS4</i>	GGCTTTCATCCGATTGTGTTG ATGCCACCTGTCCTTACCTG	55.4
C97637.graph_c0	<i>PsCCD4</i>	GTGAGGCATTTGCTTTCCG TGCTGGGTTTCTCCTATCTG	55.3
C111758.graph_c0	<i>PsPPIL1</i>	TCCCCTCCAATATTCCTCC AACTCAACCCCTCCGATT	52.2
C120729.graph_c1	<i>Hypothetical protein</i>	CACATGAAGAGGACGACCAA CCACATACATCAACCCAGGAC	56.5
Ubiquitin	Ubiquitin	GACCTATACCAAGCCGAAG CGTTCACGACCACAATC	55.1

2 结果与分析

2.1 测序数据组装结果

对照组 (ck₁、ck₂ 和 ck₃) 与高温 (40 ℃) 处理组 (TE₁、TE₂ 和 TE₃) 样本经过测序后, 获得 45.97 Gb 的有效序列读长, 且 6 个样品 Q₃₀ 碱基百分比值均大于等于 96.71%(表 2)。转录本序列数量 (transcript number) 总计 151 939 条, 非冗余基因序列数量 (unigene number) 54 935 条, 有较高的组装完整性。经拼接后片段重叠群 N50 长度为 1 561 nt, 平均长度为 1 042 nt, 长度为 300~500 nt 的单基因簇数量占组装总量的 36.1%, 有 19 834 条。长度 500~1 000 nt 的数量次之, 占总量的 28.94%。大于 2 000 nt 的占总量的 13.33%(图 1)。

2.2 转录组单基因簇的数据库功能注释

将单基因簇基因序列分别在各数据库注释, 其中以非冗余蛋白质数据库 (Nr) 获得注释的比例最高, 达到 98.76%(表 3)。

根据非冗余蛋白质数据库中的物种注释对比, 做出对应注释图和 *E* 值分布图, 大部分序列 (29.13%) *E* 值为 0~10⁻¹⁵⁰ (图 2A), 25.78% 的序列相似度大于 80.00%(图 2B); 另外, 22.43% 的单基因簇基因可注释到葡萄 *Vitis vinifera*, 6.56% 的单基因簇序列可以注释到欧洲栓皮栎 *Quercus suber*(图 2C)。

2.3 响应高温胁迫的差异基因功能富集分析

以差异倍数 ≥ 2 和错误发现率 ≤ 0.01 为标准, 共筛选获得 7 673 个差异基因, 其中 4 220 个基因上调表达, 3 453 个基因下调表达。利用 Web 基因本体论注释软件进行基因本体富集分析 (表 4), 有 6 443 个差异基因富集于生物过程, 主要集中于代谢过程 (1 702 个, 占 26.42%, GO: 0008152)、细胞进程 (1 489 个, 占 23.11%, GO: 0009987) 和单一生物进程 (1 148 个, 占 17.82%, GO: 0044699); 有 6 491 个差异基因富集于细胞组分, 主要集中于细胞 (1 316 个, 占 20.27%, GO: 0005623)、细胞组分 (1 302 个, 占 20.06%, GO: 0044464) 和细胞膜 (1 232 个, 占 18.98%, GO: 0016020); 有 3 812 个差异基因富集于分子功能, 主要分布在催化活性 (1 719 个, 占 39.95%, GO: 0003824)、结合活性 (1 523 个, 占 35.09%, GO: 0005488) 和转运活性 (291 个, 占 7.63%, GO: 0005215) 等过程。

将高温组 (TE₁、TE₂、TE₃) 与对照组 (ck₁、ck₂、ck₃) 相比, 进行全基因组及代谢途径调控网络富集分析, 共有 949 个差异基因 (different expression gene set, DEGs) 可注释到全基因组及代谢途径通路中 (表 5)。集中在碳代谢途径 (carbon metabolism) 和内质网蛋白质加工 (protein processing in endoplasmic reticulum) 的差异基因数量较多 (99 个和 59 个), 其次是苯丙烷类生物合成 (phenylpropanoid biosynthesis)

表 2 样品测序数据评估统计表

Table 2 Statistical table of sample sequencing data evaluation				
样品名称	读取碱基数/个	总碱基数/个	GC碱基数比例/%	≥Q ₃₀ 碱基百分比/%
ck ₁	24 156 058	7 200 895 958	44.96	96.78
ck ₂	24 256 024	7 236 093 266	44.76	96.89
ck ₃	25 256 661	7 530 655 892	44.53	96.74
TE ₁	30 430 627	9 077 213 032	43.68	96.79
TE ₂	22 967 108	6 856 944 378	43.95	96.73
TE ₃	27 110 006	8 071 678 010	43.68	96.71
合计	154 176 484	45 973 480 536		

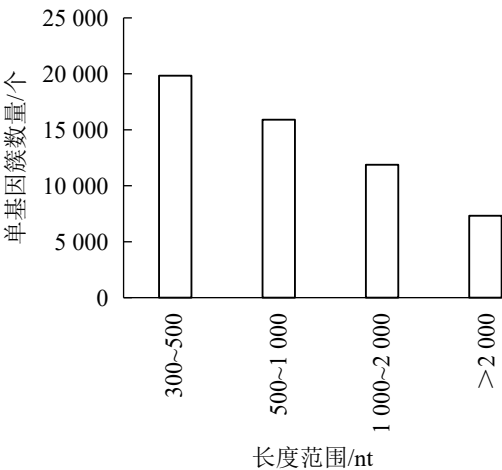
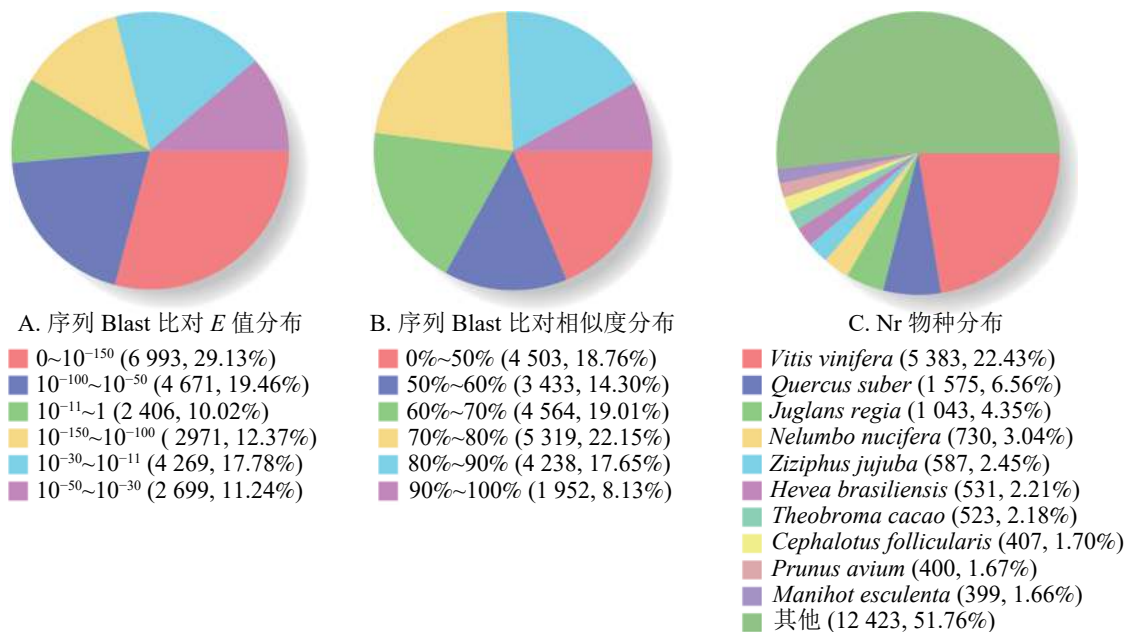


图 1 单基因长度分布

Figure 1 Demo unigene length distribution

表 3 单基因簇的注释统计

Table 3 Unigene annotation statistics				
数据库	注释		300 ≤ 长度 < 1 000 nt	长度 ≥ 1 000 nt
	数量	百分比/%		
COG	6 915	28.44	1 698	5 217
GO	14 568	59.93	5 011	9 557
KEGG	8 416	34.62	2 813	5 603
KOG	13 669	56.23	4 761	8 908
Pfam	15 108	62.15	4 096	11 012
Swissprot	15 426	63.46	4 825	10 601
Egglog	21 798	89.67	7 891	13 907
Nr	24 009	98.76	9 509	14 500
总数	24 309	100.00	9 731	14 578



括号前一个数值表示 Nr 数据库中单基因簇在每个条目里的数量, 后一个百分数表示此数量占全部单基因簇的比值

图 2 非冗余蛋白质注释分布

Figure 2 Nr annotation distribution

表 4 差异表达基因本体注释

Table 4 Difference expression gene GO annotation statistics

注释本体类别	编号	功能类型	基因注释数量	比例/%	注释本体类别	编号	功能类型	基因注释数量	比例/%
生物过程	1	代谢过程	1 702	26.42	细胞组分	26	复杂大分子复合体	242	3.73
	2	细胞进程	1 489	23.11		27	细胞外区域	63	0.97
	3	单一生物进程	1 148	17.82		28	细胞连接	54	0.83
	4	生物调节	457	7.09		29	共质体	53	0.82
	5	定位	436	6.77		30	腔上包膜	48	0.74
	6	应激反应	366	5.68		31	超分子复合物	17	0.26
	7	细胞组分及生物合成	213	3.31		32	细胞外区域部分	8	0.12
	8	信号转导	128	1.99		33	病毒体	4	0.06
	9	发育过程	123	1.91		34	病毒体部分	4	0.06
	10	多细胞机体进程	122	1.89		35	拟核	2	0.03
	11	繁殖	74	1.15	分子功能	36	催化活性	1 719	39.95
	12	繁殖进程	74	1.15		37	结合	1 523	35.09
	13	有机体进程	49	0.16		38	转运活性	291	7.63
	14	生化解毒	35	0.54		39	结构分子活性	58	1.52
	15	生长	15	0.23		40	核酸结合转录因子活性	46	1.21
	16	免疫系统进程	9	0.14		41	分子功能调节器	46	1.21
	17	细胞活动	2	0.03		42	信号传感器活动	35	0.92
	18	节律进程	1	0.02		43	抗氧化活性	27	0.71
	19	生物黏附	0	0		44	分子传感器活性	26	0.68
细胞组分	20	细胞	1 316	20.27		45	电子载体活动	21	0.55
	21	细胞组分	1 302	20.06		46	转录因子活性	14	0.37
	22	细胞膜	1 232	18.98		47	养分储藏活性	4	0.10
	23	细胞膜组成	935	14.40		48	蛋白质标签	1	0.03
	24	细胞器	866	13.34		49	翻译调节器活动	1	0.03
	25	细胞器成分	345	5.32		50	金属伴侣蛋白活性	0	0

说明: 生物过程编号为1~19; 细胞组分编号为20~35; 分子功能编号为36~50

和糖酵解/糖异生途径 (glycolysis/gluconeogenesis)。表明在高温刺激后，牡丹中的多种代谢途径、生物合成途径和内质网蛋白加工途径等均发生变化，积极参与应激响应。

表 5 高温处理下差异表达基因的代谢通路分析

Table 5 Analysis of metabolic pathways for gene expression of differences under high temperature treatment			
全基因组及代谢途径通路术语	基因数目/个	全基因组及代谢途径编号	校正后P值
苯丙烷生物合成	47	ko00940	1.00E-07
内质网蛋白质加工	59	ko04141	5.50E-02
脂肪酸延伸率	14	ko00062	3.41E-05
萜类骨架的生物合成	26	ko00900	6.79E-05
光合生物中的碳固定	38	ko00710	7.39E-05
氮代谢	15	ko00910	7.84E-05
碳代谢	99	ko01200	1.23E-04
光合作用	25	ko00195	3.69E-04
类黄酮生物合成	12	ko00941	5.23E-04
脂肪酸降解	22	ko00071	9.32E-04
亚油酸代谢	6	ko00591	7.97E-03
α -亚麻酸代谢	18	ko00592	9.71E-03
鞘脂代谢	12	ko00600	9.81E-03
丙酮酸代谢	37	ko00620	1.11E-02
氨基酸代谢	17	ko00460	1.12E-02
缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的降解	19	ko00280	1.30E-02
类固醇生物合成	12	ko00100	1.33E-02
脂肪酸代谢	25	ko01212	1.61E-02
谷胱甘肽代谢	27	ko00480	1.65E-02
其他聚糖降解	10	ko00511	1.70E-02
光合作用-天线蛋白质	8	ko00196	9.17E-03
糖酵解/糖异生	41	ko00010	2.24E-02
油菜素类固醇生物合成	6	ko00905	2.34E-02
甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸的代谢	21	ko00260	5.25E-02

2.4 实时荧光定量分析

为了进一步验证转录组数据，随机选取 10 个上调和下调的差异基因，分别是热激蛋白 70(*PsHSP70*, c65824.graph_c0)、核糖体蛋白 S4(*PsRPS4*, c119988.graph_c0)、酸性黏多糖 (*PsAMP1*, c120725.graph_c0)、肽基脯氨酰顺反异构酶 (*PsPPIL1*, c111758.graph_c0)、4-香豆酸辅酶 A 连接酶 (*Ps4CL1*, c114411.graph_c0)、阳离子氨基酸转运蛋白 5(*PsCAT5*, c106006.graph_c0)、叶绿素酶 (*PsCHL1*, c111201.graph_c0)、类胡萝卜素裂解双加氧酶 (*PsCCD4*, c97637.graph_c0)、腺苷甲硫氨酸脱羧酶样原酶 (*PsSAMDC*, C112526.graph_c0) 以及假定蛋白 (c120729.graph_c1)，使用 qRT-PCR 的方法进行验证分析 (图 3)，两者在变化趋势和差异倍数总体相符，表明测序结果相对可信。

2.5 高温胁迫下牡丹‘羽红’热激蛋白 *HSP* 基因挖掘及表达分析

分析测序发现：17 个热激蛋白基因在高温胁迫后显著上调表达 (表 6)，这些热激蛋白多定位在细胞核、线粒体、叶绿体和细胞质等部位。选取 6 个 *PsHSP* (*PsHSP1*、*PsHSP2*、*PsHSP4*、*PsHSP5*、*PsHSP7*、*PsHSP11*) 分别在 25 和 40 ℃ 处理下进行时空表达分析 (图 4)。在 40 ℃ 高温处理下，6 个 *PsHSP* 表达呈

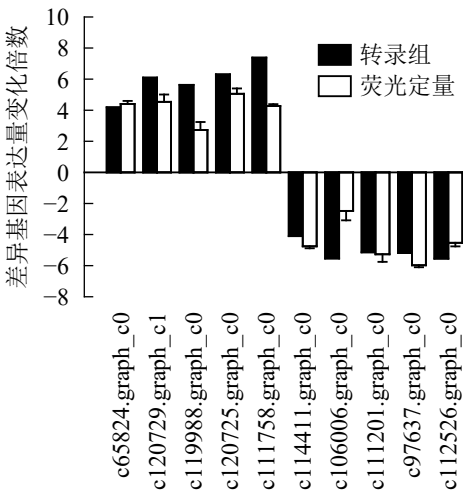
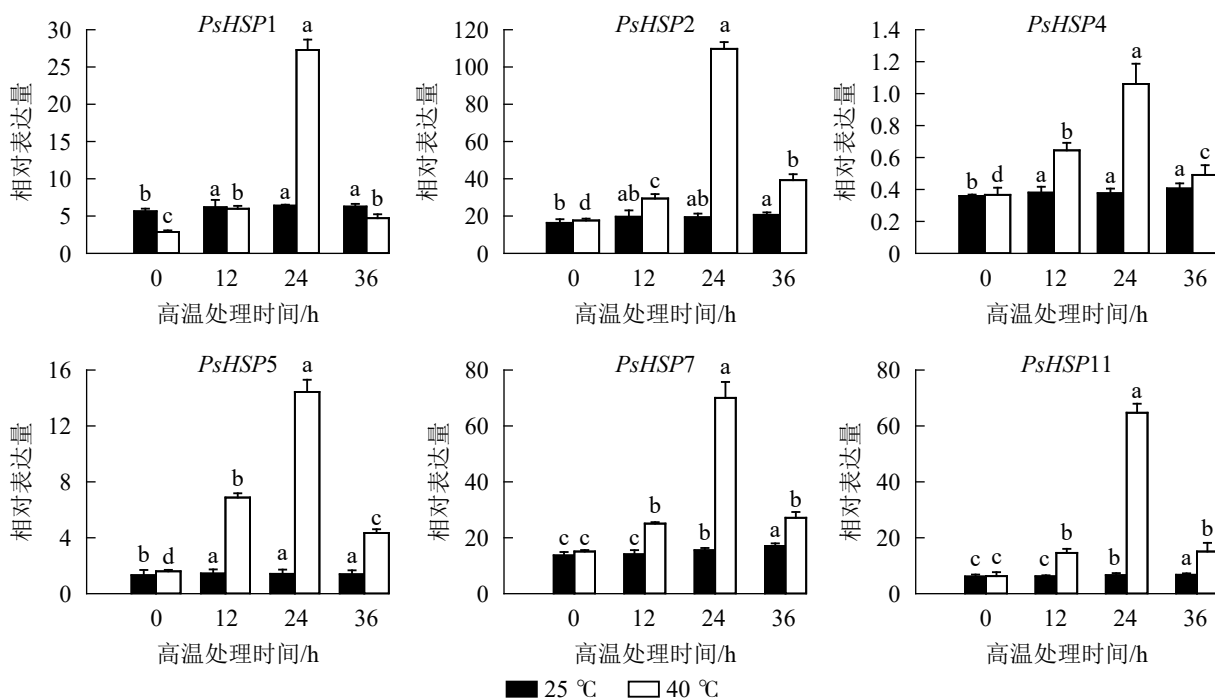


图 3 差异基因定量表达及转录组测序比较
Figure 3 Real-time fluorescence quantitative results for differential genes

表6 牡丹叶片响应高温的差异热激蛋白基因

Table 6 Peony leaves respond to high temperature heat shock DEGs

基因编号	基因命名	基因表达量		$\log_2 A$	亚细胞位置预测
		对照组25℃	高温组40℃		
c112621.graph_c0	<i>PsHSP1</i>	2.61	295.98	6.83	内质网
c107551.graph_c0	<i>PsHSP2</i>	59.46	2 254.78	5.24	细胞核
c114303.graph_c1	<i>PsHSP3</i>	161.17	440.53	1.45	线粒体
c112152.graph_c0	<i>PsHSP4</i>	11.64	162.01	3.80	线粒体
c117526.graph_c2	<i>PsHSP5</i>	7.06	172.15	4.61	细胞核
c103807.graph_c0	<i>PsHSP6</i>	10.79	26.40	1.29	线粒体
c116391.graph_c0	<i>PsHSP7</i>	150.15	2 659.72	4.15	叶绿体/细胞质
c100675.graph_c0	<i>PsHSP8</i>	21.49	215.13	3.32	叶绿体/细胞质
c117374.graph_c1	<i>PsHSP9</i>	100.54	591.55	2.88	叶绿体
c114184.graph_c0	<i>PsHSP10</i>	11.60	136.37	3.56	叶绿体/细胞质
c119657.graph_c2	<i>PsHSP11</i>	63.38	3 980.17	5.97	细胞质
c100778.graph_c0	<i>PsHSP12</i>	102.14	614.30	2.59	叶绿体/线粒体
c120033.graph_c1	<i>PsHSP13</i>	127.21	608.07	2.26	细胞核
c114516.graph_c1	<i>PsHSP14</i>	5.79	28.50	2.30	细胞膜
c118563.graph_c0	<i>PsHSP15</i>	9.93	58.46	2.56	叶绿体
c111652.graph_c0	<i>PsHSP16</i>	15.34	34.67	1.18	细胞核
c65824.graph_c0	<i>PsHSP17</i>	33.61	873.89	4.19	线粒体



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)

图4 高温处理后不同时间 HSP 的 qRT-PCR 表达变化

Figure 4 qRT-PCR detection of HSP in different time periods after high temperature treatment

上升趋势,且全部于24 h达到最大值,之后便呈现下降趋势;25℃条件下,6个*PsHSP*表达变化相对稳定。

3 讨论

全球变暖使得世界上许多地区农业受到不同程度的热害影响。近年来,植物耐热性研究逐渐受到关

注。短期或持续高温胁迫引起植物形态和生理生化方面的改变, 影响植物生长发育的同时也导致农林经济产量下降^[1, 30-31]。高温是限制牡丹生长的重要因素且严重影响其观赏性。通过 RNA-Seq 测序发现: 牡丹‘羽红’高温胁迫后共有 7 673 个基因差异表达, 这些差异基因在基因本体注释主要集中在代谢过程、细胞过程和单一生物过程; 全基因组及代谢途径数据库富集分析发现: 大部分 DEGs 富集在碳代谢、内质网蛋白质的加工途径; 同时, 苯丙烷生物合成、光合生物中的碳固定、糖酵解/糖异生和丙酮酸代谢等途径均受到高温胁迫的影响。

极端温度可以造成植物体内蛋白质功能障碍导致生长发育受限, 热激蛋白 HSPs 参与植物细胞膜稳定及相关代谢过程^[12, 30], 在响应和调节高温胁迫的过程中发挥重要作用^[32-34]。芍药 *PIHSP70* 基因过表达拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 发现, *PIHSP70* 对拟南芥高温的耐受性有正向调节作用, 高温处理后转基因株系的叶绿素荧光值明显高于野生型植株, 此外还具有更加完整的细胞膜、叶绿体和淀粉颗粒。百合 *Lilium brownie LIHSP70* 基因异源转化拟南芥, *LIHSP70* 可以增强转基因植株的高温耐性; 烟草 *Nicotiana tabacum* Class I 类热激蛋白 *TLHS1* 基因在烟草幼苗中的表达水平与耐热性有较强的相关性, *TLHS1* 转至烟草幼苗经过高温胁迫 1~4 h 后, 子叶开张率比转反义转基因烟草幼苗高出 1 倍以上。本研究发现: 高温胁迫后, 共有 17 个 *PsHSP* 基因在牡丹中上调表达, 且 *PsHSP1*、*PsHSP2*、*PsHSP4*、*PsHSP5*、*PsHSP7* 和 *PsHSP11* 在高温处理后表达上调 3 倍以上; 同时 *PsHSPs* 时空表达也发现, *PsHSP* 随热胁迫时间增加而表达量上升, 24 h 后达到最大值后便逐渐下降, 说明 *PsHSP* 基因可能在短期内迅速响应高温胁迫并参与牡丹的耐热调控。综上, 通过转录组测序发现, 高温显著影响牡丹的代谢和生物合成等过程, 从而抑制牡丹的生长和发育。*PsHSP* 基因可在短期内迅速响应高温胁迫并参与牡丹的耐热调控。本研究可为进一步探究牡丹耐高温胁迫的分子机制提供依据。

4 参考文献

- [1] 郭建平. 气候变化对中国农业生产的影响研究进展[J]. 应用气象学报, 2015, 26(1): 1-11.
GUO Jianping. Advances in impacts of climate change on agricultural production in China [J]. *J Appl Meteorol Sci*, 2015, 26(1): 1-11.
- [2] KOTAK S, LARKINDALE J, LEE U, *et al.* Complexity of the heat stress response in plants [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2007, 10(3): 310-316.
- [3] 许蓝心, 田如男. 观赏植物耐热性研究进展[J]. 亚热带植物科学, 2019, 48(1): 96-102.
XU Lanxin, TIAN Runan. Advances in research on ornamental plant heat tolerance [J]. *Subtrop Plant Sci*, 2019, 48(1): 96-102.
- [4] 郝召君, 周春华, 刘定, 等. 高温胁迫对芍药光合作用、叶绿素荧光特性及超微结构的影响[J]. 分子植物育种, 2017, 15(6): 2359-2367.
HAO Zhaojun, ZHOU Chunhua, LIU Ding, *et al.* Effects of high temperature stress on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and ultrastructure of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) [J]. *Mol Plant Breed*, 2017, 15(6): 2359-2367.
- [5] 骆俊, 韩金蓉, 王艳, 等. 高温胁迫下牡丹的抗逆生理响应[J]. 长江大学学报(自然科学版), 2011, 8(2): 223-226, 287-288.
LUO Jun, HAN Jinrong, WANG Yan, *et al.* Response of heat stress on the physiological biochemistry of *Paeonia suffruticosa* [J]. *J Yangtze Univ Nat Sci Ed*, 2011, 8(2): 223-226, 287-288.
- [6] 彭勇政, 刘智媛, 朱晓非, 等. 5 个月季品种高温处理后生理指标变化及其耐热性评价[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2019, 37(5): 53-58.
PENG Yongzheng, LIU Zhiyuan, ZHU Xiaofei, *et al.* Physiological index changes and heat tolerance evaluation of five rose cultivars after high temperature treatment [J]. *J Shanghai Jiaotong Univ Agric Sci*, 2019, 37(5): 53-58.
- [7] 李永华, 孙丽丹, 苏志国, 等. 短期高温对牡丹叶片光合作用及相关生理指标的影响[J]. 河南科学, 2008, 26(3): 291-293.
LI Yonghua, SUN Lidan, SU Zhiguo, *et al.* Effects of short-term high temperature on photosynthesis and related physiological indices in the leaves of *Paeonia suffruticosa* [J]. *Henan Sci*, 2008, 26(3): 291-293.

- [8] 骞光耀, 孔祥生, 张淑玲. 3个牡丹品种对高温胁迫的生理响应[J]. 江苏农业科学, 2017, **45**(12): 103 – 105.
QIAN Guangyao, KONG Xiangsheng, ZHANG Shuling. Physiological response of three *Paeonia suffruticosa* varieties to high temperature stress [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2017, **45**(12): 103 – 105.
- [9] 贾琪, 吴名耀, 梁康迳, 等. 基因组学在作物抗逆性研究中的新进展[J]. 中国生态农业学报, 2014, **22**(4): 375 – 385.
JIA Qi, WU Mingyao, LIANG Kangjing, *et al.* Advances in applications of genomics in stress resistance studies of crops [J]. *Chin J Eco-Agric*, 2014, **22**(4): 375 – 385.
- [10] 祝小云. 切花非洲菊苗期在高温胁迫中的生理生化响应和转录组分析[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2016.
ZHU Xiaoyun. *Physiological and Biochemical Responses of Gerbera Cultivars to Heat Stress and Transcriptome Analysis* [D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2016.
- [11] LI Yongfang, WANG Yixing, TANG Yuhong, *et al.* Transcriptome analysis of heat stress response in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) [J]. *BMC Plant Biol*, 2013, **13**(1): 153 – 164.
- [12] WANG Wangxia, VINOCUR B, SHOSEYOY O, *et al.* Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response [J]. *Trends Plant Sci*, 2004, **9**(5): 244 – 252.
- [13] OHAMA N, SATO H, SHINOZAKI K, *et al.* Transcriptional regulatory network of plant heat stress response [J]. *Trends Plant Sci*, 2017, **22**(1): 53 – 65.
- [14] BUCHANAN B B, GRUISSEM W, JONES R L. 等. 植物生物化学与分子生物学 (2004) [M]. 瞿礼嘉, 顾红雅, 白书农, 等译. 北京: 科学出版社, 2004.
- [15] LIU Liang, CHEN Jiyun, YANG Bo, *et al.* Crystal structure and function of an unusual dimeric Hsp20.1 provide insight into the thermal protection mechanism of small heat shock proteins [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, **458**(2): 429 – 434.
- [16] HU Xiuli, YANG Yanfang, GONG Fangping, *et al.* Protein sHSP26 improves chloroplast performance under heat stress by interacting with specific chloroplast proteins in maize (*Zea mays*) [J]. *J Proteomics*, 2014, **115**: 81 – 92.
- [17] GAO Lulu, MA Yuzhu, WANG Peng, *et al.* Transcriptome profiling of clematis *apiifolia*: insights into heat-stress responses [J]. *DNA Cell Biol*, 2017, **36**(11).
- [18] 王莲英. 中国牡丹品种图志 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1997: 2–28.
- [19] 史倩倩. 基于转录组测序序牡丹花色形成分子调控机理研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2015.
SHI Qianqian. *Studies on the Molecular Mechanism of Paeonia delavayi Flower Color Formation* [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2015.
- [20] 张庆雨, 于蕊, 谢力行, 等. 牡丹种子脂肪酸合成相关基因 *PrLPAAT4* 的克隆与表达分析 [C]//中国园艺学会观赏园艺专业委员会、国家花卉工程技术研究中心. 中国观赏园艺研究进展 (2018). 北京: 中国林业出版社, 2018: 502 – 511.
- [21] 郑艳伟. 江南牡丹品种资源调查与引种栽培研究 [D]. 杭州: 浙江农林大学, 2009.
ZHENG Yanwei. *The Study on the Investigation of Tree Peony Varieties and Its Introduction Cultivation in the South Yangtze River of China* [D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2009.
- [22] 张佳平, 李丹青, 聂晶晶, 等. 高温胁迫下芍药的生理生化响应和耐热性评价 [J]. 核农学报, 2016, **30**(9): 1848 – 1856.
ZHANG Jiaping, LI Danqing, NIE Jingjing, *et al.* Physiological and biochemical responses to the high temperature stress and heat resistance evaluation of *Paeonia lactiflora* Pall. cultivars [J]. *J Nucl Agric Sci*, 2016, **30**(9): 1848 – 1856.
- [23] MALONE J H, OLIVER B C. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome [J]. *BMC Biol*, 2011, **9**(1): 34. doi: [10.1186/1741-7007-9-34](https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-34).
- [24] PATEL R K, MUKESH J. NGS QC Toolkit: a toolkit for quality control of next generation sequencing data [J]. *PLoS One*, 2012, **7**(2): e30619. doi: [10.1371/journal.pone.0030619](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030619).
- [25] TRAPNELL C, HENDRIEKSON D G, SAUVAGEAU M, *et al.* Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, **31**(1): 46 – 53.
- [26] LIVAK K J, LIVAK SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402 – 408.
- [27] ARYA M, SHERGILL I S, WILLIAMSON M, *et al.* Basic principles of real-time quantitative PCR [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2005, **5**(2): 209 – 219.
- [28] 马月萍, 戴思兰, 马艳蓉. 荧光定量 PCR 技术在植物研究中的应用 [J]. 生物技术通报, 2011(7): 37 – 45.

- MA Yueping, DAI Silan, MA Yanrong. Application of technique of quantitative real-time PCR in research of lants [J]. *Biotechnol Bull*, 2011(7): 37 – 45.
- [29] 王彦杰, 董丽, 张超, 等. 牡丹实时定量 PCR 分析中内参基因的选择[J]. 农业生物技术学报, 2012, **20**(5): 521 – 528.
- WANG Yanjie, DONG Li, ZHANG Chao, *et al.* Reference gene selection for real-time quantitative PCR normalization in tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) [J]. *J Agric Biotechnol*, 2012, **20**(5): 521 – 528.
- [30] WAHID A, GELANI S, ASHRAF M, *et al.* Heat tolerance in plants: an overview [J]. *Environ Exp Bot*, 2007, **61**(3): 199 – 223.
- [31] YIN Hui, CHEN Qiuming, YI Mingfang. Effects of short-term heat stress on oxidative damage and responses of antioxidant system in *Lilium longiflorum* [J]. *Plant Growth Regul*, 2008, **54**(1): 45 – 54.
- [32] ZHAO Daqiu, XIA Xing, SU Jianghong, *et al.* Overexpression of herbaceous peony *HSP70* confers high temperature tolerance[J]. *BMC Genomics*, 2019, **20**(1): 70. doi: [10.1186/s12864-019-5448-0](https://doi.org/10.1186/s12864-019-5448-0).
- [33] 宫本贺. 百合热激转录因子 L1HSFA1 及其下游热激蛋白 L1HSP70 响应热胁迫的机制解析[D]. 北京: 中国农业大学, 2014.
- GONG Benhe. *Mechanism Analysis of Response to Heat Stress of LIHSFA1 and its Downstream LIHSP70 from Lily(Lilium longiflorum)*[D]. Beijing: China Agricultural University, 2014.
- [34] SOO M P, CHOO B H. Class I small heat-shock protein gives thermotolerance in tobacco [J]. *J Plant Physiol*, 2002, **159**(1): 25 – 30.