

# 2种虾脊兰属(*Calanthe* R. Br.)植物热胁迫 相关基因表达模式分析

陈伦妍<sup>1</sup>, 朱雅婷<sup>2</sup>, 陆艾鲜<sup>1,3</sup>, 吴悠<sup>1</sup>, 冀宏宇<sup>1</sup>, 陈志清<sup>4</sup>, 吴沙沙<sup>1</sup>, 翟俊文<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>福建农林大学风景园林与艺术学院/兰科植物保护与利用国家林业和草原局重点实验室, 福州 350002; <sup>2</sup>上海交通大学设计学院, 上海 200240; <sup>3</sup>上海辰山植物园华东野生濒危资源植物保育中心, 上海 201602; <sup>4</sup>福建不耕农业科技有限公司, 福州 350012)

**摘要:** 虾脊兰属(*Calanthe* R. Br.)植物物种多样性丰富,但在全球变暖的环境影响下,极端高温天气频繁出现,加剧了非生物胁迫对该属物种生存和繁殖的危害。本研究以兰科(Orchidaceae Juss.)6种虾脊兰属植物作为研究对象,通过高温半致死生理实验初步确定不同虾脊兰属植物的耐热性,并挑选耐热型银带虾脊兰(*Calanthe argenteostriata* C. Z. Tang & S. J. Cheng)和热敏感型三棱虾脊兰(*C. tricarinata* Lindl.)进行转录组测序,以筛选热胁迫相关基因,并分析其表达差异及功能。同时利用实时荧光定量PCR技术检测其基因在不同温度下的表达模式,分析相关基因与耐热性的关系。结果表明:(1)6种虾脊兰属植物的耐热性由弱至强排序:三棱虾脊兰<钩距虾脊兰<三褶虾脊兰<西南虾脊兰<中华虾脊兰<银带虾脊兰。(2)在耐热型银带虾脊兰和热敏感型三棱虾脊兰中鉴定到响应热胁迫的基因家族包括HSP、HSF、LEA、XTH、TIL。(3)三棱虾脊兰耐热相关基因表达的上限温度为30℃,超过该温度则对三棱虾脊兰造成伤害;银带虾脊兰9个耐热相关的差异基因在40℃下依然保持较高的表达量,可能因此获得了对高温胁迫较高的耐受性。本研究从分子水平上探究虾脊兰属植物对高温的响应,为筛选耐热性关键基因及培育耐热性较强的园林植物提供重要的线索,对现代园林育种具有重要的指导意义和应用价值。

**关键词:** 虾脊兰属植物;热胁迫;热胁迫相关基因;热激蛋白

## The Analysis of Expression Patterns of Heat Stress-related Genes in Two Species of *Calanthe* R. Br.

CHEN Lunyan<sup>1</sup>, ZHU Yating<sup>2</sup>, LU Aixian<sup>1,3</sup>, WU You<sup>1</sup>, JI Hongyu<sup>1</sup>, CHEN Zhiqing<sup>4</sup>, WU Shasha<sup>1</sup>, ZHAI Junwen<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of Landscape Architecture and Art, Fujian Agriculture and Forestry University/Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration for Orchid Conservation and Utilization, Fuzhou 350002; <sup>2</sup>School of Design, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240; <sup>3</sup>Eastern China Conservation Centre for Wild Endangered Plant Resources, Shanghai Chenshan Botanical Garden, Shanghai 201602; <sup>4</sup>Fujian Bugeng Agricultural Technology Co., Ltd, Fuzhou 350012)

**Abstract:** The species diversity of *Calanthe* R. Br. is rich. However, under the influence of global warming, extreme high temperature weather frequently occurs, which exacerbates the harm of abiotic stress on the survival and reproduction of *Calanthe*. In this study, six species of *Calanthe* were analyzed for heat tolerance via applying means of high-temperature semi-lethal physiological experiments. *Calanthe argenteostriata* C. Z. Tang & S. J. Cheng and *C. tricarinata* Lindl., which were identified to be heat tolerant or sensitive, respectively, were used for transcriptome sequencing and identification of differentially-expressed genes (DEGs) under heat stress treatment conditions. In addition, their transcriptional profiles at different temperatures were detected by real-time fluorescent quantitative PCR technology. The research results were included: (1) The heat tolerance of six species of *Calanthe* is ranked from weak to strong: *C. tricarinata* Lindl., *C. graciliflora* Hayata, *C. triplicata*

收稿日期: 2023-02-17 修回日期: 2023-04-13 网络出版日期: 2023-04-28

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230217001>

第一作者研究方向为兰科植物杂交育种, Email: 3388645193@qq.com; 朱雅婷为共同第一作者

通信作者: 翟俊文, 研究方向为兰科植物资源与利用, Email: zhai-jw@163.com

基金项目: 国家重点研发计划子课题(2020YFD1000404-02); 福建农林大学“乡村振兴服务团队”支持计划项目(11899170124)

**Foundation projects:** National Key Research and Development Sub-project(2020YFD1000404-02); Fujian Agricultural and Forestry University “Rural Revitalization Service Team” Support Project(11899170124)

(Willem.) Ames, *C. herbacea* Lindl., *C. sinica* Z. H. Tsi, *C. argenteostriata* C. Z. Tang & S. J. Cheng. (2) Gene families responsible to heat stress were identified, including HSP, HSF, LEA, XTH, TIL. (3) In *C. tricarinata* Lindl., the up-regulated expression threshold of DEGs was 30 °C, and the temperature over 30 °C might cause heat damage. In *C. argenteostriata* C. Z. Tang & S. J. Cheng, nine DEGs were highly expressed at 40 °C, possibly resulting in an improvement of tolerance to heat stress. This study explored the response of *Calanthe* to heat stress at the molecular level, provided important clues for identifying key genes of heat tolerance and cultivating garden heat tolerant plants, which might provide reference in modern garden breeding.

**Key words:** species of *Calanthe* R. Br.; heat stress; heat stress-related genes; heat shock protein

热胁迫(HS, heat stress)以不同方式影响细胞内的蛋白质、细胞膜和骨架结构的稳定性等,从而对生物体造成伤害,极端高温的胁迫可以在几分钟之内导致细胞损坏或死亡<sup>[1]</sup>。HS很大程度上影响植物的种子萌发<sup>[2]</sup>、花粉减数分裂和发育<sup>[3]</sup>、根系扩张<sup>[1]</sup>等,使其生长缓慢、发育异常。兰科植物中也观察到了热胁迫相关的情况,如周桂英等<sup>[4]</sup>观察高温处理后的大花蕙兰(*Cymbidium hybridum* spp.) 8个品种的叶片变化情况,发现当温度高于30 °C时,热敏感品种的叶片出现较为直观的干尖、失水等热害症状;当白天温度超过26 °C,喜凉爽的附生兰花*Odontioda*在6周内植物叶片出现坏死<sup>[5]</sup>。短期的高温胁迫下三褶虾脊兰(*C. triplicata* (Willem.) Ames)、淡红离翅兰(*C. rubens* Ridl.)和长距虾脊兰(*C. sylvatica* (Thou.) Lindl.)的弱光利用能力明显降低<sup>[6]</sup>。从全年平均气温在7.5~12 °C的高山地区引种三棱虾脊兰于25~30 °C的温室中,植株可以正常生长,但可能由于温度过高不能进行花芽分化,导致次年不开花<sup>[7]</sup>。高温对兰科植物的外部形态、光合作用和花芽分化等有较大的影响,但关于兰科植物耐热相关基因的研究较少。

植物虽不能通过移动避开高温,但可通过各种热响应基因的表达以减少变构蛋白质带来的危害,以维持自身正常的生理活动和新陈代谢反应。目前有大量基因被证明受逆境诱导,如胚胎发育后期丰富蛋白(LEA, late embryogenesis abundant)、热激蛋白(HSP, heat stress protein)、木葡聚糖内转葡糖基酶/水解酶(XTH, xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase)、温度诱导载脂蛋白(TIL, temperature induced lipocalins)等,当耐热型和热敏感型植物受到胁迫时,这些基因呈现出差异表达<sup>[8-11]</sup>。其中LEA和HSP是胁迫诱导(水、盐分和极端温度等)的2个主要蛋白质,具有保护细胞的作用<sup>[12]</sup>。上述基因可作为筛选耐热与不耐热基因型的生物标记,是培育耐热型园林植物的重要研究对象。

虾脊兰属植物属于热带起源,后因全球气候变冷逐渐向低海拔区域扩散<sup>[13]</sup>,使得该属植物在应对温度变化时产生了新的适应性,因此与温度的耐受性有着一定的关联,是研究适应性较理想的材料。目前关于虾脊兰属植物耐热相关基因的研究也较少。本研究选取不同温度适应性的虾脊兰属植物作为研究对象,从转录组数据库筛选热胁迫反应的差异基因,寻找不同高温抵抗力的虾脊兰属植物,对研究该属的环境适应性进化和定向育种有一定的参考价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 6种虾脊兰属植物半致死温度检测

本研究以6种虾脊兰属植物钩距虾脊兰(*Calanthe graciliflora* Hayata)、三棱虾脊兰(*C. tricarinata* Lindl.)、西南虾脊兰(*C. herbacea* Lindl.)、三褶虾脊兰、中华虾脊兰(*C. sinica* Z. H. Tsi)和银带虾脊兰(*C. argenteostriata* C. Z. Tang & S. J. Cheng)为研究对象,均为人工繁育苗,种源的原生分布地带分别为福建省福州市晋安区寿山乡(海拔295 m)、陕西汉中(海拔1800 m)、云南景东(海拔11159 m)、云南芒市(海拔2377 m)、云南文山(海拔1278 m)和福建省福州市晋安区(海拔560 m)。

于2020年10月在福建农林大学兰科植物保护与利用国家林业和草原局重点实验室进行取样。选取生长情况基本一致、健康且无病虫害的植株,每种各取3株用于试验。具体步骤:取植株第二叶片,剪去主脉,以0.5 cm × 0.5 cm大小均匀剪取叶片,准确称量0.2 g,放入含20 mL去离子水的离心管中浸泡20 min。将离心管置于水浴锅加热,加热温度分别设定为35 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C、60 °C、65 °C、70 °C,各水浴20 min。取出置于25 °C室温下自然冷却,测其电导率( $C_t$ )。再将所有离心管置于100 °C高温下煮沸15 min,测其电导率( $C_m$ )。以室温下叶片的电导率( $C_{CK}$ )作为对照。每个温度处理重复

3次。细胞伤害率 $= (C_t - C_{CK}) / (C_m - C_{CK}) \times 100\%$ <sup>[14]</sup>。

利用 Logistic 回归方程  $y = k / (1 + ae^{-bt})$  拟合, 其中  $y$  为细胞伤害率,  $t$  为不同的处理温度,  $k$  为细胞伤害率的饱和容量。方程经线性化处理后采用直线回归法求得方程参数  $a$ 、 $b$ , 代入公式得到曲线拐点  $T = \ln a / b$ ,  $T$  即半致死温度 ( $LT_{50}$ )。

## 1.2 转录组取样和测序

耐热型银带虾脊兰和热敏感型三棱虾脊兰的染色体倍性均为二倍体。将耐热型银带虾脊兰和热敏感型三棱虾脊兰置于温度为 25 °C/20 °C、光周期为 12 h 光照/12 h 黑暗的光照培养箱中同步培养 7 d, 每个物种取 3 个生物学重复作为对照组(未热激)。在高温试验组中, 为方便高温处理后快速取样, 先用超纯水将全株冲洗 3 遍, 清除病叶, 再放入 37 °C 下热激 2 h, 每个物种取 3 个生物学重复作为高温试验组。分别剪取对照组和高温试验组的叶片组织, 迅速放入液氮中冷冻, 并置于 -80 °C 超低温冰箱内保存, 用于提取 RNA, 后在 Illumina 测序平台进行转录组测序, 3 个生物学重复中, 取重复性较高的 2 个进行下一步试验。银带虾脊兰对照组品种为 CARG25、高温组品种为 CARG37, 来自福建省福州市晋安区; 三棱虾脊兰对照组品种为 CTRI25、高温组品种为 CTRI37, 来自陕西汉中。

## 1.3 转录组文库构建、测序、组装及分析

转录组测序文库构建与测序: 该部分工作均由深圳华大基因股份有限公司完成。试验步骤如下:

(1) 用带有 Oligo(dT) 的磁珠对银带虾脊兰和三棱虾脊兰的 mRNA 进行富集, 用 DNA 探针杂交 rRNA, RNaseH 选择性消化 DNA/RNA 杂交链, 再用 DNaseI 消化掉 DNA 探针, 纯化后即得到所需 RNA。之后加入 buffer 将 mRNA 打断, 获得若干 mRNA 短片段。

(2) 以得到的短片段为模板, 加入六碱基随机引物(random hexamers)进行反转录, 再合成第一条 cDNA 链。加入缓冲液、dNTPs 和 DNA 聚合酶 I 合成第二条 cDNA 链, 获得双链 cDNA。

(3) 使用 AMPure XP beads 纯化双链 cDNA 后进行末端修复, 加 poly(A) 并连接测序接头, 用 AMPure XP beads 选择片段大小, 最后进行 PCR 扩增。

(4) 建好的 cDNA 文库用 Agilent 2100 对文库插入的片段进行质检, 基于 Sequencing By Synthesis 技术使用 Illumina HiSeqTM2000 进行 cDNA 文库测序。

组装和分析: 在正式分析之前, 去除包含接头的 Reads(接头污染), 去除未知碱基 N 含量大于 5%

的 Reads 和低质量 Reads(质量值低于 15 的碱基占该 Reads 总碱基数的比例大于 20% 的 Reads 为低质量的 Reads), 获得高质量片段(Clean reads), 使用 Trinity 对 Clean reads(去除 PCR 重复以提高组装效率)进行 *de novo* 组装, 然后使用 Tgic1 将组装的转录本进行聚类去冗余, 得到单基因(Unigene)。获得不含未知碱基的长片段, 作为组装得到的 Unigene, 去除冗余 Unigene, 进行拼接, 进一步得到三棱虾脊兰和银带虾脊兰的 All-Unigene。

## 1.4 转录组数据功能注释

利用 Blastn 将三棱虾脊兰和银带虾脊兰的 Unigene 序列在公共数据库进行相似度比较搜索比对。样本分别在非冗余蛋白数据库(NR, non-redundant protein sequence database)、去冗余的蛋白序列数据库(Swiss-Prot, swiss-prot protein sequence database)、基因功能分类数据库(GO, gene ontology)、真核生物蛋白相邻类的聚簇数据库(KOG, clusters of orthologous groups for eukaryotic complete genomes)、基因功能和代谢途径数据库(KEGG, kyoto encyclopedia of genes and genomes)和 Pfam 数据库(Protein family)中进行功能注释, 获得 Unigene 的功能注释信息。

## 1.5 转录组 RNA-seq 差异表达基因分析

为了评估三棱虾脊兰和银带虾脊兰高温处理前后的每个 Unigene 的表达水平, 采用 FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million fragments mapped)方法对 Unigene 表达进行归一化, 消除不同 Unigene 长度与测序量差异对计算表达量的影响, 从而准确地反映基因表达水平。计算得到的基因表达量可直接用于比较不同样品间的基因表达差异, 后续就可以通过基因注释的结果来分析这些差异表达基因的表达模式聚类。3 个生物学重复中, 取重复性较高的重复组, 使用 TBTOOL 软件绘制基因表达量聚类热图<sup>[15]</sup>。利用 edgeR<sup>[16]</sup>进行差异显著性分析, 将  $FDR < 0.05$ ,  $|\log_2 FC| > 1$  判断为差异表达基因, 对差异基因进行筛选获得三棱虾脊兰和银带虾脊兰温度处理前后的差异基因。

## 1.6 实时荧光定量 PCR

在 25 °C(对照组)、30 °C、35 °C 和 40 °C 下处理 2 h, 取三棱虾脊兰和银带虾脊兰的叶片, 研磨, 使用 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司, 中国北京)进行总 RNA 的提取, 再用 PrimerScript RT reagent Kit with gDNA Eraser(翌圣生物科技(上海)股份有限公司, 中国上海)进行反转录, 最后采用 2×TB GreenPremix



Ex Taq II 试剂(翌圣生物科技(上海)股份有限公司, 中国上海)进行实时荧光定量 PCR 验证, 实验步骤和计算方法根据说明书进行操作。

## 2 结果与分析

### 2.1 高温胁迫下 6 种虾脊兰属植物半致死高温的确定

如图 1 所示, 在不同高温处理下, 6 种虾脊兰属植物叶片受到的伤害程度呈典型的“S”型曲线, 即

“慢-快-慢”的增长趋势。在 40~50 ℃ 之间, 细胞伤害率的变化较稳定; 当温度升至 50 ℃ 时, 6 种植物的细胞伤害率迅速上升; 当超过 60 ℃ 时细胞伤害率的趋势逐渐变得平缓。结合表 1 半致死温度的计算, 推测虾脊兰属不同植物的高温半致死温度范围在 52~56 ℃ 之间, 其耐热性强度由弱至强排序: 三棱虾脊兰<钩距虾脊兰<三褶虾脊兰<西南虾脊兰<中华虾脊兰<银带虾脊兰。

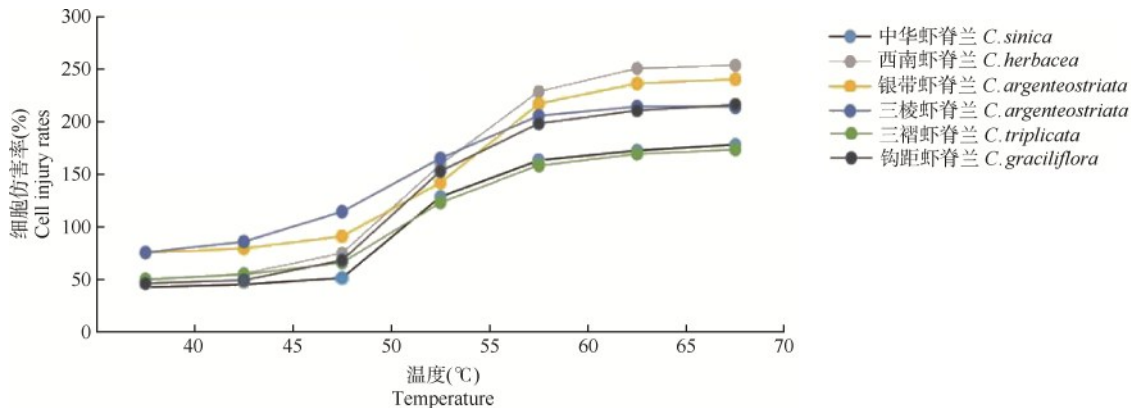


图 1 6 种虾脊兰属植物的细胞伤害率与处理温度间的关系

Fig. 1 Relationships between cell injured rates and treatment temperatures in six species of *Calanthe*

表 1 6 种虾脊兰属植物叶片的高温半致死温度

Table 1  $LT_{50}$  in leaf of six species of *Calanthe*

半致死温度排序 The ranking of $LT_{50}$	物种 Species	拟合方程 Logistic regression equation	拟合优度 $R^2$	半致死温度(℃) $LT_{50}$
6	三棱虾脊兰	$1 / (1 + 141000.3696565343 \times 0.7980207651328805)$	0.966	52.55
5	钩距虾脊兰	$1 / (1 + 43405204.75575818 \times 0.7187973424541392)$	0.975	53.26
4	三褶虾脊兰	$1 / (1 + 62446.29407705086 \times 0.8159509727357598)$	0.966	54.29
3	西南虾脊兰	$1 / (1 + 1265806.297312976 \times 0.7739439690629499)$	0.978	54.83
2	中华虾脊兰	$1 / (1 + 5783869.219598142 \times 0.7539797508609049)$	0.967	55.14
1	银带虾脊兰	$1 / (1 + 552163.749038476 \times 0.7882123099069534)$	0.969	55.56

### 2.2 高温胁迫下 2 种虾脊兰属植物转录组文库构建与组装结果

由表 2 看出, 银带虾脊兰对照组(CARG25)的测序分别产生了  $6.41 \times 10^7$ 、 $6.41 \times 10^7$  和  $6.39 \times 10^7$  个 Reads, 高温组(CARG37)分别产生  $6.39 \times 10^7$ 、 $6.39 \times 10^7$  和  $6.41 \times 10^7$  个 Reads; 三棱虾脊兰对照组(CTRI25)的测序分别产生了  $6.40 \times 10^7$ 、 $6.38 \times 10^7$  和  $6.40 \times 10^7$  个 Reads, 高温组(CTRI37)分别产生  $6.35 \times 10^7$ 、 $6.40 \times 10^7$  和  $6.39 \times 10^7$  个 Reads。

### 2.3 2 种虾脊兰属植物转录组单基因的功能注释和分类

将银带虾脊兰测序得到的单基因(Unigene)比对到 GO 数据库中(图 2), 共有 153, 404 个 Unigene

被注释到 GO 功能分类中。生物过程(Biological process)模块中被注释到的 Unigene 最多, 其中细胞生理过程(Cellular process)占比最高(13.62%); 分子功能(Molecular function)模块中结合绑定(Binding)占比最高(16.02%); 细胞组分(Cellular component)模块中细胞解剖实体(Cellular anatomical entity)占比最高(17.21%)。

将三棱虾脊兰测序得到的 Unigene 比对到 GO 数据库中(图 3), 共有 179, 527 个 Unigene 被注释到 GO 功能分类中。生物过程模块中被注释到的 Unigene 最多, 其中细胞生理过程占比最高(13.7%); 分子功能模块中结合绑定占比最高(15.3%); 细胞组分模块中细胞解剖实体占比最高(17.22%)。

表 2 银带虾脊兰和三棱虾脊兰的质量测序评估统计表  
Table 2 Quality sequencing assessment statistics of the *C. argenteostriata* and *C. tricarinata*

样品编号 Samples ID	过滤后序列 Clean reads	总数量 (bp) Total number	总长度 (bp) Total length	平均长度 (bp) Mean length	N50
CARG25-01	6.41×10 <sup>7</sup>	38,941	38,952,215	1,000	1,546
CARG25-02	6.41×10 <sup>7</sup>	37,885	38,802,465	1,024	1,570
CARG25-03	6.39×10 <sup>7</sup>	39,435	40,083,628	1,016	1,574
CARG37-01	6.39×10 <sup>7</sup>	34,925	33,151,051	949	1,440
CARG37-02	6.39×10 <sup>7</sup>	35,847	35,123,325	979	1,498
CARG37-03	6.41×10 <sup>7</sup>	34,783	34,687,345	997	1,522
单基因总数 All-Unigene	/	63,736	71,658,251	1,124	1,753
CTRI25-01	6.40×10 <sup>7</sup>	37,409	37,361,153	998	1,548
CTRI25-02	6.38×10 <sup>7</sup>	41,482	35,790,967	862	1,328
CTRI25-03	6.40×10 <sup>7</sup>	36,604	37,312,025	1,019	1,561
CTRI37-01	6.35×10 <sup>7</sup>	35,977	36,396,237	1,011	1,538
CTRI37-02	6.40×10 <sup>7</sup>	35,650	36,646,585	1,027	1,570
CTRI37-03	6.39×10 <sup>7</sup>	33,872	33,109,270	977	1,456
单基因总数 All-Unigene	/	76,176	77,818,498	1,021	1,637

样品编号命名规则: 物种拉丁名首字母简称+处理温度+生物学重复编号  
The sample number consists of Latin initials of species, processing temperature, and biological repeat number

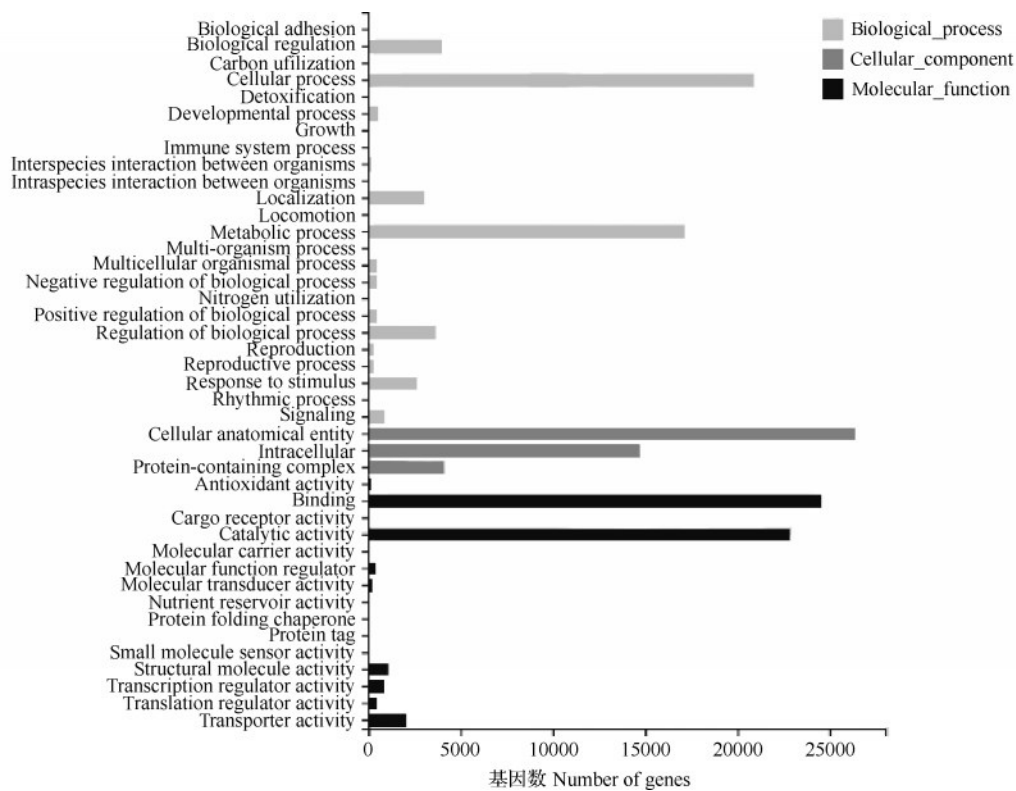


图 2 银带虾脊兰 GO 注释结果分类  
Fig. 2 The category result of GO annotation of *C. argenteostriata*

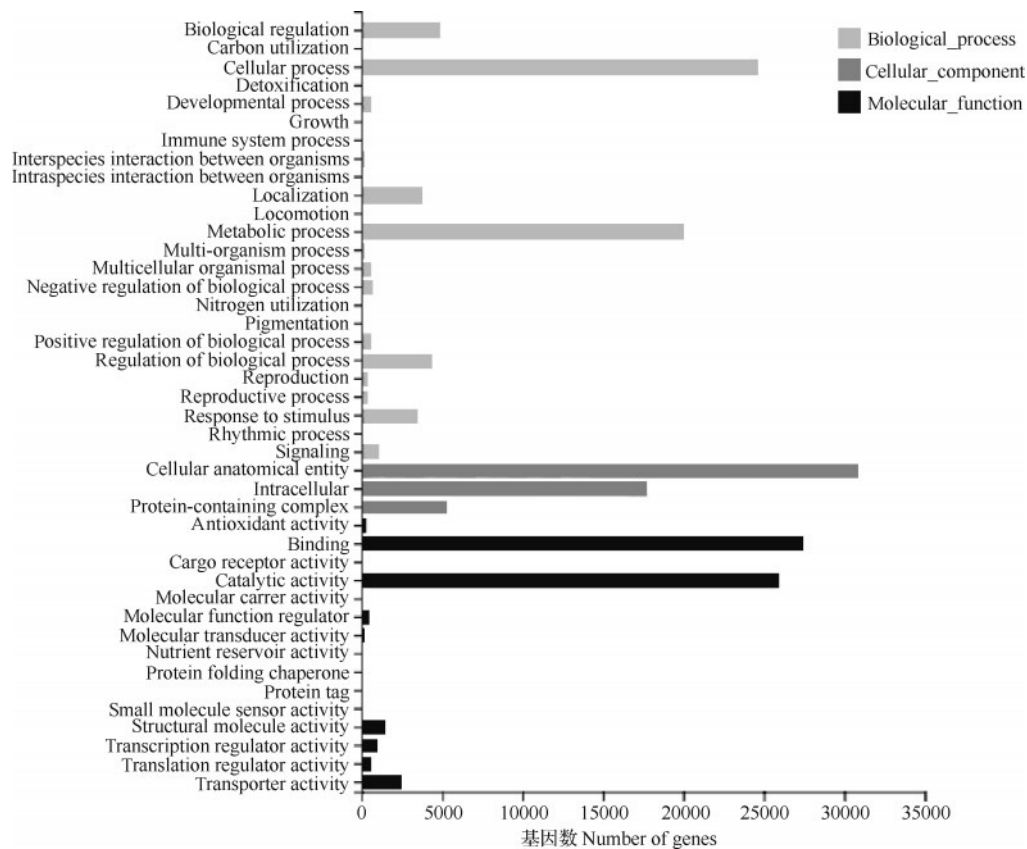


图3 三棱虾脊兰GO注释结果分类

Fig. 3 The category result of GO annotation of *C. tricarinata*

在KEGG数据库中,银带虾脊兰的19,135个Unigene和三棱虾脊兰的40,807个Unigene分别被注释到135个通路中,富集最多的前5条通路分别为RNA转运(RNA transport)、核糖体(Ribosome)、

内质网中蛋白加工(Protein processing in endoplasmic reticulum)、剪接体(Spliceosome)、植物-病原体互作(Plant-pathogen interaction)途径(表3)。

表3 银带虾脊兰和三棱虾脊兰Unigene的KEGG注释

Table 3 KEGG annotation of Unigene in *C. argenteostriata* and *C. tricarinata*

通路编号	通路名称	银带虾脊兰中数目	三棱虾脊兰中数目
Pathway ID	Pathway name	Count in <i>C. argenteostriata</i>	Count in <i>C. tricarinata</i>
ko03013	RNA 转运	1,534	1,593
ko03010	核糖体	1,135	1,562
ko04141	内质网中蛋白加工	1,125	1,434
ko03040	剪接体	1,098	1,392
ko04626	植物-病原体互作	1,066	1,137

2.4 2种虾脊兰属植物关键功能基因筛选及表达模式分析

热激转录因子(HSF, heat stress factor)、脱水应答元件结合蛋白(DREB, dehydration-responsive element-binding protein)是近年来研究较多的与植物高温胁迫抗性相关的转录因子,同时也有一些较大的转录因子家族(WRKY、MYB、NAC等)参与热激响应<sup>[18-19]</sup>。通过比较差异表达基因,鉴定到HSF、AP2-EREBP(一类脱水应答元件结合蛋白)、MYB、

NAC、WRKY的数量占全部转录因子的一半。如图4所示,耐热型银带虾脊兰的热胁迫因子比热敏感型三棱虾脊兰发生更强烈的上下调,且HSF在2个物种中的数量均呈现明显差异。

将这5种转录因子的差异基因进行蛋白网络互作分析(图5),它们参与调控银带虾脊兰应答热胁迫的互作网络比三棱虾脊兰复杂。银带虾脊兰HSF(Unigene9645\_All,命名为CARGHSF-1)与其他4种转录因子都存在网络互作调控,三棱虾脊兰

HSF(CL8463.Contig8\_All,命名为*CTRIHSF-1*)仅与AP2-EREBP存在网络调控关系。

当银带虾脊兰和三棱虾脊兰受到高温胁迫时,

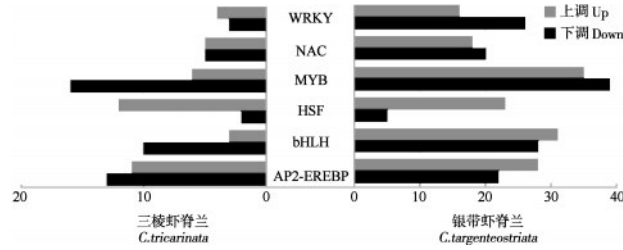


图4 高温下5种转录因子差异基因统计

Fig. 4 Statistics of DEGs of 5 transcription factors under high temperature

差异基因的KEGG富集结果一致显示出,内质网中蛋白加工的通路影响较大,且鉴定到物种中大量热激蛋白的差异基因富集于该通路中。如图6所示,

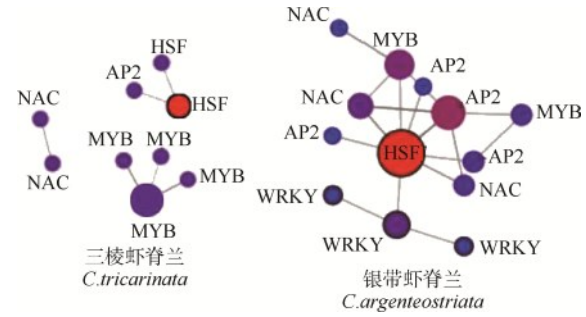
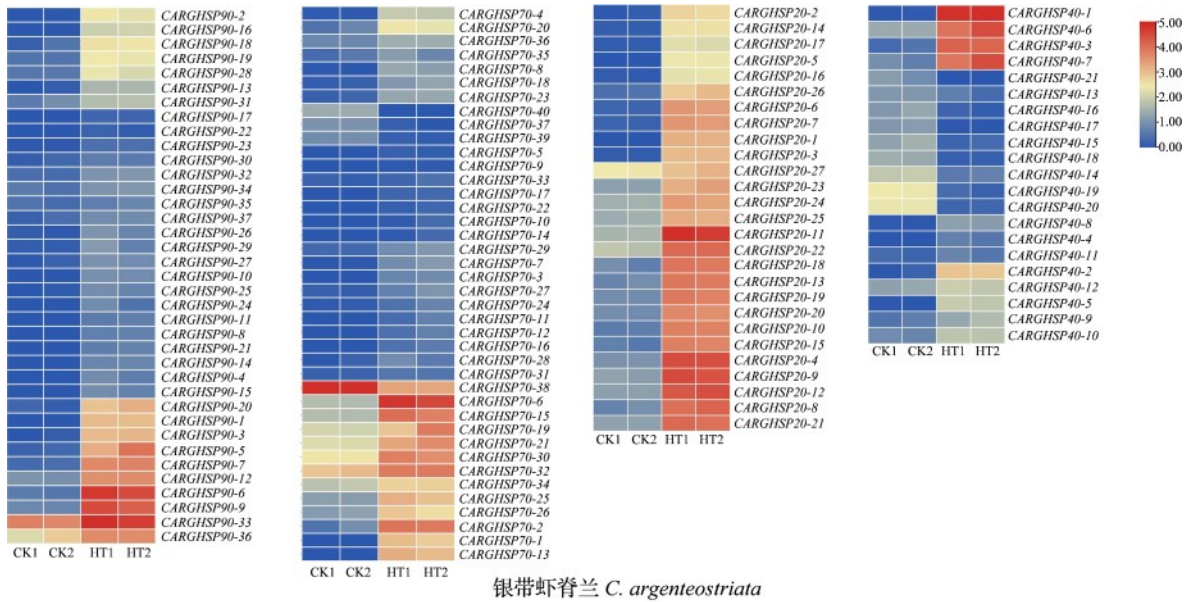
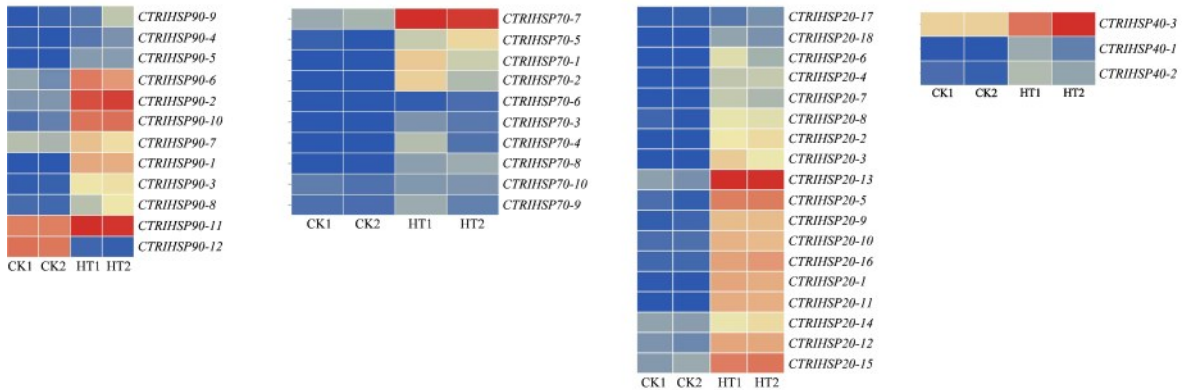


图5 转录因子蛋白网络图

Fig. 5 Analysis of protein interactions of transcription factors



银带虾脊兰 *C. argenteostriata*



三棱虾脊兰 *C. tricarinata*

CK 1/2 为对照组 1/2, HT 1/2 为高温组 1/2。基因名称命名规则:物种拉丁名首字母+基因家族名称+基因排列序号;下同  
CK 1/2 indicates control group 1/2, and HT 1/2 indicates high-temperature group 1/2. Gene name consists of Latin initials of species, gene family name, and gene sequence number; the same as below

图6 内质网通路中HSP基因家族响应热胁迫的表达量聚类热图

Fig. 6 The clustering heat map of the expression of HSP gene family in the endoplasmic pathway in response to heat stress



银带虾脊兰共鉴定 125 个差异热激蛋白基因,包括 37 个 *HSP90*、40 个 *HSP70*、21 个 *HSP40* 和 27 个 *HSP20*。受热胁迫后 *HSP90* 和 *HSP20* 全部上调,其中 *HSP90* 上调表达明显的数量较少,25 个 *HSP20* 的差异倍数在 5 倍以上,1 个在 5 倍以下,上调表达极为明显。36 个 *HSP70* 上调差异基因,差异倍数 5 倍以上有 18 个,4 个下调差异基因。8 个 *HSP40* 差异基因表现为下调,上调差异基因 13 个,差异倍数 5 倍以上 8 个。

三棱虾脊兰共鉴定 43 个差异热激蛋白基因,包括 12 个 *HSP90*、10 个 *HSP70*、3 个 *HSP40* 和 18 个 *HSP20* (图 6)。受热胁迫后有 *HSP40*、*HSP70* 和 *HSP20* 全部上调,其中 16 个 *HSP20* 的差异倍数在 5 倍以上,2 个在 5 倍以下,上调表达极为明显。7 个 *HSP70* 的差异倍数在 5 倍以上,3 个在 5 倍以下。7

个 *HSP90* 的差异倍数在 5 倍以上,4 个差异倍数 5 倍以下,1 个下调基因。

本研究在拟南芥数据库中搜索 53 个与耐热相关的基因,最终鉴定到 XTH、TIL、LEA 基因家族与 2 种虾脊兰属植物的高温响应相关。如图 7 所示,银带虾脊兰和三棱虾脊兰均鉴定到 5 个 LEA 基因,相比对照组高温实验组表达量全部呈上调。XTH 基因的调控在 2 个物种的转录组中略有差异:高温诱导下,银带虾脊兰中 XTH 基因存在明显的差异,其中有 9 条基因(*CARGXTH-9* 至 *CARGXTH-17*)呈上调;三棱虾脊兰 XTH 差异基因全部为下调。同样,鉴定到 TIL 差异基因在银带虾脊兰(*CARGTIL-1* 和 *CARGTIL-2*)呈上调表达,而三棱虾脊兰中 TIL 不存在差异表达(图 7)。

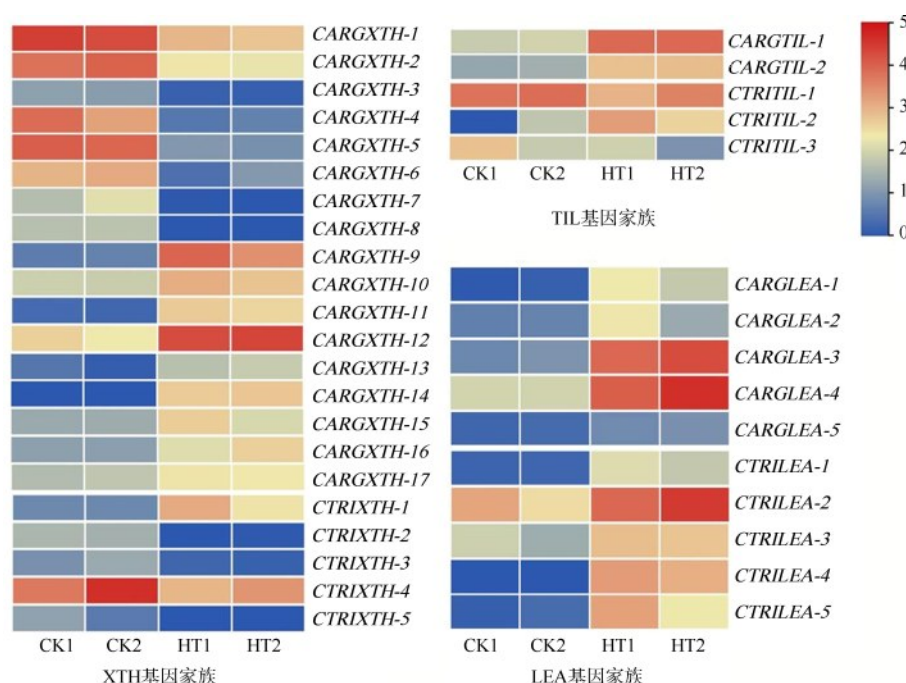


图 7 LEA、XTH 和 TIL 基因家族响应热胁迫的表达量聚类热图

Fig. 7 Clustering heat map of the expression of LEA, XTH and TIL gene family in response to heat stress

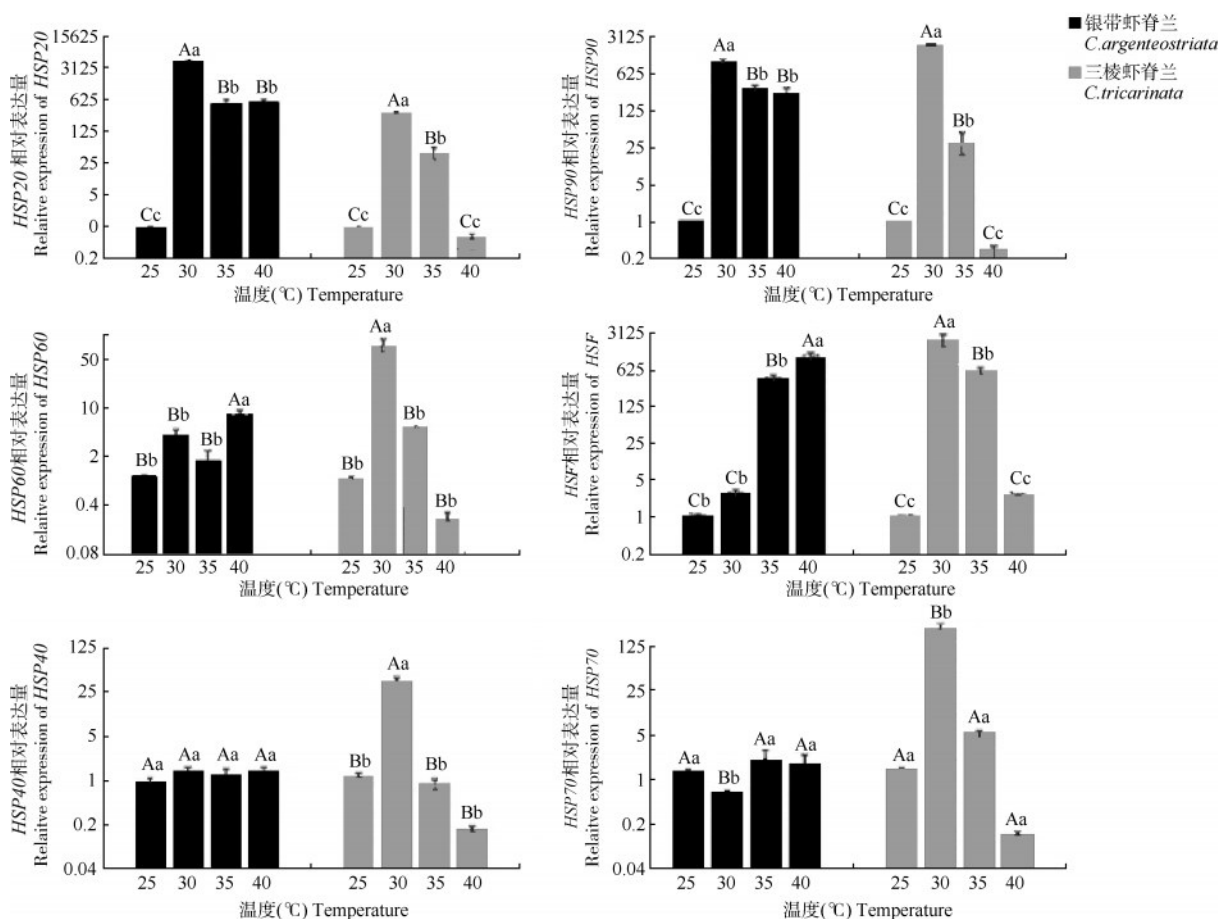
## 2.5 实时荧光定量 PCR 表达模式分析

为探究在不同温度条件下的基因表达量变化,在鉴定的 5 个基因家族(HSF、HSP、LEA、XTH 和 TIL)中选取显著差异表达的基因用于实时荧光定量 PCR 实验,发现在 2 种虾脊兰中 HSP 的表达模式不同。银带虾脊兰中表达模式较复杂(图 8),*HSP20* 和 *HSP90* 表达模式相似,但 *HSP20* 表达量差异倍数最大。*HSP60* 在 30℃ 时上调后又下调,在 40℃ 表达量最高,表现出上调的趋势。HSF 表达量随着温度增加而增加。*HSP40* 和 *HSP70* 表达模式相似,受热激调控的表达量差异性并不显著。三

棱虾脊兰中表达模式相对简单(图 8),*HSP20*、*HSP90*、*HSP60*、*HSP40*、*HSP70* 及 HSF 在 35℃ 时表达量迅速下跌,40℃ 时表达量低于对照组,呈下调状态。

在 40℃ 高温处理时,LEA 基因在 2 种虾脊兰中的表达量都达到显著或极显著水平,但在应对高温时其在 2 种虾脊兰中的表达模式不同(图 9)。银带虾脊兰中 *CARGLEA-4* 基因呈先下降后增长的趋势;三棱虾脊兰内的表达量具有一定的维持性,呈间断性增高。如图 10 所示,XTH 和 TIL 表达模式与图 6 结果相似,银带虾脊兰中基因表达量随着温度增加呈明显上调趋势,且高于三棱虾脊兰的表达量。





小写字母表示  $P < 0.01$ , 表达量达到极显著差异; 大写字母表示  $P < 0.05$ , 表达量达到显著差异, 下同

Lowercase letter indicated  $P < 0.01$ , and the expression level showed a highly significant difference; Uppercase letter indicated  $P < 0.05$ , and the expression level showed a significant difference, the same as below

图8 HSP和HSF基因家族在不同温度下的表达量

Fig. 8 Expression level of HSP and HSF gene family at different temperatures

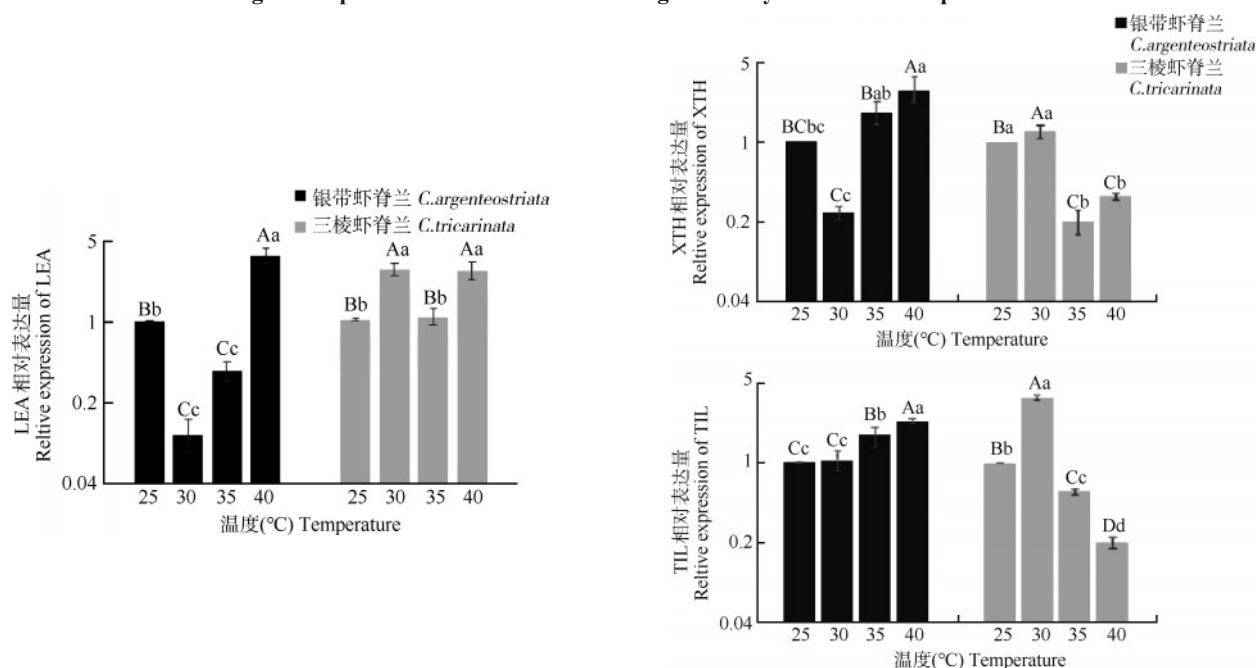


图9 LEA基因家族在不同温度下的表达量

Fig. 9 Expression level of LEA gene family at different temperatures

图10 XTH和TIL基因家族在不同温度下的表达量

Fig. 10 Expression level of XTH and TIL gene family at different temperatures

### 3 讨论

#### 3.1 半致死温度与耐热性的关系

植物细胞膜对维持细胞正常代谢发挥着重要的作用,当超过临界温度时,细胞膜的蛋白结构被破坏,透性增加使得细胞内电解质泄露,导致电导率上升<sup>[17]</sup>。因此,细胞膜的热稳定性可反映植物耐热能力<sup>[18]</sup>。本研究通过 35~70℃ 的高温处理测定 6 种虾脊兰属植物叶片的电导率,结果显示,不同高温胁迫与细胞伤害率之间呈典型的“S”型曲线,且 Logistic 方程参数  $R^2$  均值超过 0.708,已达到极显著水平<sup>[19]</sup>。在 40~50℃ 时 6 种虾脊兰属植物细胞膜受到的伤害为可逆的,表明细胞初期的自我保护使得电导率上升较缓慢;随着温度增加到 65~70℃ 后,细胞受到的可逆伤害逐渐转化为不可逆的伤害,说明此时温度使得膜脂被破坏,呈现出保持不变的趋势。当温度超过一定范围,细胞膜伤害可逆性便开始向不可逆转变,但不同耐热性的虾脊兰属植物的电导率变化幅度不一致,表明自我保护在不同物种上表现不同。这与不同品种杜鹃的耐热性研究相似,耐热性弱的品种细胞受到不可逆的伤害的温度比耐热性强的品种更低<sup>[20]</sup>。

电导率法测定方法简便易行,可作为植物抗热性数量指标,是公认的耐热性鉴定方法。通过电导率法结合 Logistic 方程求得植物半致死温度,已经广泛得到应用,如杜鹃(*Rhododendron* spp.)<sup>[20]</sup>、茶树(*Camellia sinensis* (L.) O. Ktze.)<sup>[18]</sup>、菊花(*Chrysanthemum* spp.)<sup>[21]</sup>、芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.)<sup>[22]</sup>和草莓(*Fragaria × ananassa* Duch.)<sup>[23]</sup>。草莓品种的高温半致死温度和田间热害指数呈显著负相关,且半致死温度和死亡率相关系数为 -0.871,验证了半致死温度判断草莓耐热性的可靠性<sup>[23]</sup>。本研究通过半致死温度判断银带虾脊兰和中华虾脊兰耐热性较高,其次是西南虾脊兰、三褶虾脊兰和钩距虾脊兰,耐热性最低的是三棱虾脊兰。6 种虾脊兰属植物的半致死高温都超过 50℃,耐热性与菊花、茶树相近<sup>[18,21]</sup>,意味着具有一定的耐热性,但在实际的园林应用中,耐热性可能不如这两者。

植物的耐热性受多种因素的影响,其耐热生理过程错综复杂。本研究测定了 6 种虾脊兰属植物叶片的电导率,所得到的  $LT_{50}$  只是比较耐热性的依据之一。若要更加精确地判断虾脊兰属植物的耐热性,还需结合抗热性相关的生理、生化指标,如叶绿素(Chl, chlorophyll)总量、丙二醛(MDA,

malondialdehyde)含量、脯氨酸(Pro, proline)含量,特别是超氧化物歧化酶(SOD, superoxide dismutase)、过氧化物酶(POD, peroxidase)及过氧化氢酶(CAT, catalase)活性等来综合评价<sup>[24-26]</sup>。

#### 3.2 不同温度变化下 2 种虾脊兰属植物的热响应富集分析

本研究通过转录组测序分析 2 种不同温度适应型的虾脊兰属植物对高温胁迫的响应机制差异。GO 富集分析可以更加有效地对差异表达基因进行生物学功能鉴定和识别,银带虾脊兰和三棱虾脊兰 GO 分类到 3 大类、39 小类,且富集较多的功能分类均为细胞解剖实体(Cellular anatomical entity)、结合绑定(Binding)和催化活性(Catalytic activity)。这些研究结果与非洲菊(*Gerbera jamesonii* Bolus)和辣椒(*Capsicum annum* L.)的热胁迫响应相似,参与到结合绑定和催化活性功能相关的基因占主要地位<sup>[27-28]</sup>。

KEGG 通路富集分析有助于进一步了解基因的生物学功能。当细胞受到环境胁迫刺激时,内质网基质中错误折叠的蛋白质的积累会引起内质网应激,并激活称为“内质网应激反应”(ER stress response)的信号通路,从而启动 BiP 等基因的表达,促进蛋白折叠<sup>[29]</sup>。2 个物种受到热胁迫后有较多差异基因富集在内质网中的蛋白加工通路中,且大部分上调的差异基因与热应激反应相关,如 HSP90、HSP70、HSP40 和 HSP20。该理论在本研究中得到验证,且与人们对小麦(*Triticum aestivum* L.)<sup>[30]</sup>、玉米(*Zea mays* L.)<sup>[17]</sup>、茶树<sup>[31]</sup>及茄子(*Solanum melongema* L.)<sup>[32]</sup>等物种在高温胁迫下的转录组分析结果一致,为下一步筛选关键基因及研究耐热性分子机理提供了重要的线索。

#### 3.3 热激蛋白的鉴定与表达差异分析

转录组分析显示,HSP 在虾脊兰属植物中都被高温诱导,主要被富集到内质网中的蛋白加工通路中,且该通路差异倍数较大的基因主要是 HSP20。结合前人研究,小麦<sup>[30]</sup>在 37℃ 下处理 0~4 h 后, HSP20 的表达量超过其他亚家族;在辣椒<sup>[27]</sup>和茄子<sup>[32]</sup>等植物中,热胁迫后内质网中的蛋白加工通路的 HSP 基因家族中上调倍数最大且最多的也是 HSP20。这可能是由于 HSP20 不依赖 ATP 水解方式帮助变性蛋白质保持可折叠的状态<sup>[9]</sup>,被认为是蛋白质错误折叠的第一道防线<sup>[33]</sup>。通过本研究结果推断,HSP20 可能是 HSP 基因家族作为虾脊兰属植物抵抗热胁迫的主要热激蛋白。

*HSP60* 表达量在 2 种虾脊兰中也呈现差异: 在银带虾脊兰中随着温度上升呈上调趋势, 而在三棱虾脊兰中则模式相反。茄子的耐热性品系中 *HSP60* 表达量高于热敏感品系<sup>[32]</sup>; 选取剪股颖属 (*Agrostis* L.) 耐热性不同的 3 种植物, 在 40℃ 热胁迫下, 随着物种的耐热性由强到弱, 其 *HSP60* 的累计量也依次减少<sup>[34]</sup>。本研究进一步证实了 *HSP60* 的表达量与植物的耐热性呈正相关。

综上所述, 在高温胁迫中, *HSP* 基因家族是虾脊兰属植物抵抗热胁迫的主要功能基因之一。银带虾脊兰分布区域的海拔高度比三棱虾脊兰更低, 可能是因为大量的 *HSP* 同源基因相互协同作用为前者适应环境提供了更多的选择。

### 3.4 热响应主要调控因子 HSF 的表达模式与 HSP 一致

热激转录因子 (HSF, heat stress factor) 是植物受到环境胁迫后激活细胞内信号转导通路中的重要成员, 可启动及调节 *HSP* 基因的表达, 对增强植物的抗逆性具有重要作用<sup>[35]</sup>。通过蛋白互作关系和基因表达模式分析, 发现在 2 种虾脊兰属植物中 HSF 很可能在高温胁迫中发挥核心调控的作用, 而银带虾脊兰中可调控的其他转录因子多于三棱虾脊兰。实时荧光定量 PCR 检测到, 银带虾脊兰中 HSF 表达量随着温度的增加而增加, 在三棱虾脊兰中则相反。这种表达模式与 *HSP* 相似, 即物种中 HSF 上调表达阈值越高, 耐热性越强。因此, *HSP* 和 HSF 能够反映出不同物种之间的耐热性水平差异, 可作为研究虾脊兰属植物适应热胁迫的功能基因。

### 3.5 其他耐热基因差异表达模式比较

大量研究证明 LEA 蛋白的表达能够增强植物对高温、低温和干旱的耐受性。当植物处于高盐或干旱等挑战性环境中, 细胞内电解质外漏, 细胞内浓度迅速升高, 对细胞造成不可逆转的损害<sup>[11, 36]</sup>。茶树在 38℃ 热激下, 48 个 LEA 基因中有 44 个在高温响应中表达量呈现显著性提高<sup>[37]</sup>。在银带虾脊兰和三棱虾脊兰转录组数据库中鉴定到, 响应高温的 LEA 上调数量相似, 且应对高温胁迫时 LEA 表达量呈上调趋势, 表明 LEA 参与热胁迫响应。

XTH 广泛存在于植物体的各种组织和细胞中, 参与细胞壁的合成、降解与重构过程, 与细胞生长发育有关。近年来研究发现其与氧化、干旱、低温和热激等环境胁迫的响应密切相关<sup>[38]</sup>。小麦 (*Triticum turgidum* subsp. *durum* (Desf.) Husn.) 幼苗

的根系在 42℃ 下热激 2~4 h, 耐热品系中 XTH 出现上调, 而耐热性居中的品系出现下调, 不耐热品系则下调更多, 这说明 XTH 作用的差异性变化可能是对高温胁迫的响应, 从而有助于幼苗的存活生长<sup>[39]</sup>。对 XTH 进行鉴定与表达量分析发现, 银带虾脊兰中参与高温响应的 XTH 基因家族数量较多, 表达量随着温度上升而提高; 三棱虾脊兰中 XTH 则没有上调, 推测在受到热胁迫后银带虾脊兰中 XTH 基因家族成员更广泛地参与细胞壁的合成、降解和重构过程, 这可能是造成热适应性差异的原因之一。

在高温胁迫下, 细胞膜脂发生过氧化作用, 植物积累了高浓度的过氧化氢和活性氧, 导致氧化应激反应。近年来研究发现植物温度诱导型脂钙素对不同非生物胁迫的响应具有重要作用, 参与了各种压力因素和信号转导途径<sup>[40-41]</sup>。通过对转录组数据库的挖掘和实时荧光定量 PCR 实验结果分析, 可以确定虾脊兰属植物也具有这种脂钙素。对耐寒小麦 (*Triticum norstar*) 和不耐寒小麦 (*Triticum manitou*) 分别进行低温和高温处理, 发现 TIL 在耐寒品种中表达量的增加更为显著<sup>[40]</sup>。TIL 表达量在银带虾脊兰中随着温度的升高而提高, 表明 TIL 的表达增强了银带虾脊兰对高温应激的耐受性, 而三棱虾脊兰中 TIL 表达的上限温度为 30℃。

## 4 结论

(1) 6 种虾脊兰属植物的耐热性由弱至强排序: 三棱虾脊兰 < 钩距虾脊兰 < 三褶虾脊兰 < 西南虾脊兰 < 中华虾脊兰 < 银带虾脊兰。

(2) 在耐热型银带虾脊兰和热敏感型三棱虾脊兰中鉴定到响应热胁迫的基因家族包括 *HSP*、*HSF*、*LEA*、*XTH*、*TIL*; *HSP* 和 *HSF* 表达量的高低与物种的耐热性呈正相关; 高温胁迫下, 银带虾脊兰中 *TIL* 和 *XTH* 的表达量更高, 表明其细胞壁的抵抗或修复水平高于三棱虾脊兰。

(3) 三棱虾脊兰的耐热相关基因对温度的反应具有一定范围, 超过 30℃ 时则可能造成植物的热害。

本研究只是初步在转录组数据库中筛选出了 9 个关键候选基因 (*HSF*、*HSP20*、*HSP40*、*HSP60*、*HSP70*、*HSP90*、*LEA*、*XTH* 和 *TIL*), 若要深入验证这些基因具体的作用机制, 还需通过转基因进一步验证, 同时也可对不同温度下基因作用时间的变化进行更深层次的探究。



## 参考文献

- [1] Mirza H, Nahar K, Alam M, Rajib R, Fujita M. Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(5): 9643-9684
- [2] Jemaa E, Saida A, Sadok B. Impact of heat stress on germination and growth in higher plants: Physiological, biochemical and molecular repercussions and mechanisms of defence. *Journal of Biological Sciences*, 2010, 10 (6) : 565-572
- [3] Omid M, Siahpoosh M R, Mamghani R, Modarresi M. The influence of terminal heat stress on meiosis abnormalities in pollen mother cells of wheat. *Cytologia*, 2014, 79(1): 49-58
- [4] 周桂英, 王四清, 许建新, 陈卿然, 马川. 8种大花蕙兰耐热性指标筛选及其评价. *安徽农业科学*, 2016, 44(16): 20-22, 34  
Zhou G Y, Wang S Q, Xu J X, Chen Q R, Ma C. Heat resistance indexes identification and comprehensive evaluation of 8 species of *Cymbidium hybridum*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2016, 44(16): 20-22, 34
- [5] Blanchard M G, Runkle E. Temperature and pseudobulb size influence flowering of *Odontioda* orchids. *Hortscience: A Publication of the American Society for Horticultural Science*, 2008, 43(5): 1404-1409
- [6] 沈立明, 钟惠, 朱雅婷, 赵亚梅, 吴沙沙, 翟俊文. 温度胁迫下4种广义虾脊兰属植物的光合特性. *森林与环境学报*, 2021, 41(1): 60-65  
Shen L M, Zhong H, Zhu Y T, Zhao Y M, Wu S S, Zhai J W. Photosynthetic characteristics of four *Calanthe* s. l. species under temperature stress. *Journal of Forest and Environment*, 2021, 41(1): 60-65
- [7] 肖恩. 四川攀枝花市三棱虾脊兰资源调查及引种栽培. 北京: 北京林业大学, 2010  
Xiao E. Germplasm resource investigation and introduction of *Calanthe tricarinata* in Panzhihua, Szechwan. Beijing: Beijing Forestry University, 2010
- [8] Chi W T, Fung R W M, Liu H C, Hsu C C, Chang Y Y. Temperature-induced lipocalin is required for basal and acquired thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell and Environment*, 2009, 32(7): 917-927
- [9] Xu Y, Zhan C Y, Huang B G. Heat shock proteins in association with heat tolerance in grasses. *International Journal of Proteomics*, 2011, 7048: 529648
- [10] 陈棕. 苎麻XTH家族基因克隆及表达分析. 武汉: 华中农业大学, 2017  
Chen C. Cloning and expression profiling of XTH family genes in ramie. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017
- [11] Cheng Z H, Zhang X M, Yao W J, Zhao K, Liu L, Fan G F, Zhou B R, Jiang T B. Genome-wide search and structural and functional analyses for late embryogenesis-abundant (LEA) gene family in poplar. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 110
- [12] Renaut J, Hausman J F, Wisniewski M. Proteomics and low-temperature studies: Bridging the gap between gene expression and metabolism. *Physiologia Plantarum*, 2006, 126 (1) : 97-109
- [13] 陈燕琼. 广义虾脊兰属的系统发育基因组学及生物地理学研究. 福州: 福建农林大学, 2020  
Chen Y Q. Phylogenomics and biogeography of *Calanthe* s. l. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2020
- [14] 凌瑞, 戴中武, 代晓雨, 吴春梅, 翟俊文, 郑泽新, 吴沙沙. 8个绣球品种耐热性综合评价与耐热指标筛选. *热带作物学报*, 2021, 42(8): 2209-2218  
Ling R, Dai Z W, Dai X Y, Wu C M, Zhai J W, Zheng Z X, Wu S S. Evaluation of heat tolerance and screening the index for the assessment of heat tolerance in cultivars of *Hydrangea*. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2021, 42(8): 2209-2218
- [15] Chen C J, Chen H, Zhang Y, Thomas H, Frank M H, He Y H, Xia R. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202
- [16] Varet H, Guéguen L B, Coppée J Y, Dillies M A. SARTools: A DESeq2- and EdgeR-Based R pipeline for comprehensive differential analysis of RNA-seq data. *PLoS ONE*, 2016, 11 (6): e157022
- [17] 蒋玲玉. 玉米响应高温胁迫的转录组测序及关键调控基因的鉴定与分析. 芜湖: 安徽师范大学, 2019  
Jiang L Y. Transcriptome sequencing and identification and analysis of key regulatory genes in response to heat stress in maize. Wuhu: Anhui Normal University, 2019
- [18] He X Y, Ye H, Ma J L, Zhang R Q, Chen G, Xia Y Y. Semi-lethal high temperature and heat tolerance of eight *Camellia* species. *Phyton*, 2012, 81(1): 177-180
- [19] 杜人杰, 曲跃军, 陶双勇, 邹威, 王庆斌, 张翼. 6个山楂品种低温半致死温度的测定. *林业科技*, 2017(4): 17-19, 26  
Du R J, Qu Y J, Tao S Y, Zou W, Wang Q B, Zhang Y. Study on semi-lethal temperatures of six kinds *Crataegus pinnatifida*. *Forestry Science & Technology*, 2017(4) : 17-19, 26
- [20] 刘婉迪. 9个杜鹃品种对热胁迫的响应及其生理生化变化. 福州: 福建农林大学, 2018  
Liu W D. Effect of heat stress on physiological and biochemical characteristics of nine *Rhododendron* cultivars. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2018
- [21] 杨曦. 茶用菊耐热体细胞无性系变异体的研究. 武汉: 华中农业大学, 2011  
Yang X. Study on heat-resistant somaclonal variants of tea-applied chrysanthemum. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011
- [22] Zhang J P, Wang X B, Zhang D, Qiu S, Wei J F, Guo J, Li D Q, Xia Y P. Evaluating the comprehensive performance of herbaceous peonies at low latitudes by the integration of long-running quantitative observation and multi-criteria decision making approach. *Scientific Reports*, 2019, 9 (1) : 15079-15095

- [23] 李进, 顾绘, 殷琳毅. 6 个草莓品种高温半致死温度与耐热性评价. 中国果树, 2021(1): 56-58  
Li J, Gu H, Yin L Y. Evaluation of heat tolerance and high semi-lethal temperature of six strawberry cultivars. China Fruits, 2021(1): 56-58
- [24] 杨再强, 朱静, 张波, 顾礼力, 张静. 高温处理对结果期草莓叶片衰老特征的影响. 中国农业气象, 2012, 33(4): 512-518  
Yang Z Q, Zhu J, Zhang B, Gu L L, Zhang J. Effect of high temperature on the senescence feature of strawberry leaves during the fruit stage. Chinese Journal of Agrometeorology, 2012, 33(4): 512-518
- [25] 郑毅. 温度胁迫对草莓叶片光合作用的影响. 合肥: 安徽农业大学, 2005  
Zheng Y. Effect of temperature stress on photosynthesis in strawberry leaves. Hefei: Anhui Agricultural University, 2005
- [26] 赵娜, 徐庆国, 苏鹏, 梁东鸣, 唐瑶. 10 个冷季型草坪草品种在高温胁迫下的抗性. 草业科学, 2019, 36(7): 1743-1753  
Zhao N, Xu Q G, Su P, Liang D M, Tang Y. Differences in resistance to high temperature stress of 10 cold-season turfgrass varieties. Pratacultural Science, 2019, 36(7): 1743-1753
- [27] Li T, Xu X W, Li Y, Wang H M, Li Z L, Li Z X. Comparative transcriptome analysis reveals differential transcription in heat-susceptible and heat-tolerant pepper (*Capsicum annum* L.) cultivars under heat stress. Journal of Plant Biology, 2015, 58(6): 411-424
- [28] 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. 杭州: 浙江农林大学, 2016  
Zhu X Y. Physiological and biochemical responses of *Gerbera* cultivars to heat stress and anscriptome analysis. Hangzhou: Zhejiang Agriculture & Forestry University, 2016
- [29] Lwata Y, Koizumi N. Plant transducers of the endoplasmic reticulum unfolded protein response. Trends in Plant Science, 2012, 17(12): 720-727
- [30] Wang X M, Chen S Y, Shi X, Liu D N, Zhao P, Yunze L, Cheng Y B, Liu Z S, Nie X J, Weining S, Sun Q X, Xu S B, Ma C. Hybrid sequencing reveals insight into heat sensing and signaling of bread wheat. The Plant Journal, 2019, 98(6): 1015-1032
- [31] 王伟东. 高温和干旱胁迫下茶树转录组分析及 Histone H1 基因的功能鉴定. 南京: 南京农业大学, 2016  
Wang W D. Transcriptome analysis of *Camellia sinensis* under heat and drought stress and functional characterization of Histone H1 gene. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016
- [32] 庞强强. 茄子 *HSFs* 和 *HSPs* 基因鉴定及其在高温下的表达模式分析. 广州: 华南农业大学, 2016  
Pang Q Q. Genome wide identification of *HSFs* and *HSPs* gene family in eggplant (*Solanum melongema* L.) and analysis of their expression pattern under high temperature. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016
- [33] Ahsan N, Donnart T, Nouri M Z, Komatsu S. Tissue-Specific defense and thermo-adaptive mechanisms of oybean seedlings under heat stress revealed by proteomic approach. Journal of Proteome Research, 2010, 9(8): 4189-4204
- [34] Xu Y, Huang B. Differential protein expression for geothermal *Agrostis scabra* and turf-type *Agrostis stolonifera* differing in heat tolerance. Environmental & Experimental Botany, 2008, 64(1): 58-64
- [35] Ouerghi C, Gharsallah C, Bhardwaj N K, Fakhfakh H, Gorsane F. Insights into the heat-responsive transcriptional network of tomato contrasting genotypes. Plant Genetic Resources, 2021, 19(1): 1-14
- [36] Zeng X, Ling H, Yang J W, Li Y Y, Guo S X. LEA proteins from *Gastrodia elata* enhance tolerance to low temperature stress in *Escherichia coli*. Gene, 2018, 646: 136-142
- [37] 李盼松. 大豆、小麦和拟南芥热激转录因子(Hsf)基因克隆、功能验证和耐热机制研究. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016  
Li P S. Cloning, function, and thermotolerant mechanism of heat stress transcription factor (Hsf) in soybean, wheat, and *Arabidopsis*. Yangling: Northwest A&F University, 2016
- [38] 崔传磊. 茶树 XTH 基因家族响应不同浓度铝氟处理的研究. 南京: 南京农业大学, 2018  
Cui C L. The Study of XTH gene family response to different concentrations of Aluminum and Fluoride treatments on *Camellia sinensis*. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2018
- [39] Andrea I, Monica D C, Erika S, Mariarosaria D P, Patrizia R, Luigi D B, Carla P, Giuseppe D, Gabriella P, Stephen C F, Marcello L. Drought and heat differentially affect XTH expression and XET activity and action in 3-day-old seedlings of durum wheat cultivars with different stress susceptibility. Frontiers in Plant Science, 2016, 7(792420): 1686
- [40] Charron J B, Ouellet F, Pelletier M, Danyluk J, Chauve C, Sarhan F. Identification, expression, and evolutionary analyses of plant lipocalins. Plant Physiology, 2006, 139(4): 2017-2028
- [41] Atef A O, Carsjens C, Diekmann H, Fayyaz P, Herrfurth C, Feussner L, Polle A. Temperature-induced lipocalin (TIL) is translocated under salt stress and protects chloroplasts from ion toxicity. Journal of Plant Physiology, 2013, 171(3-4): 250-259