

· 研究报告 ·

薰衣草叶片对低温胁迫的生理与分子响应机制

蔺海娇, 曲嘉琪, 刘祎男, 苑泽宁*

哈尔滨师范大学生命科学与技术学院, 黑龙江省水生生物多样性研究重点实验室, 哈尔滨 150025

摘要 薰衣草(*Lavandula angustifolia*)作为名贵的芳香植物, 其生长、繁育、品质和产量均受低温影响。前期研究已获得1个耐低温薰衣草品种。该研究将对其处理的温度从20°C降至0°C, 揭示薰衣草响应冷胁迫的生理及分子调控机制, 同时结合薰衣草的细胞质膜透性、可溶性糖和蛋白质含量及抗氧化酶活性等生理变化。采用转录组学和生物信息学方法挖掘分析相关耐寒基因, 并探讨外施水杨酸缓解-10°C冻胁迫的可行性。研究发现7个编码脂肪酸去饱和酶和转移酶的基因(*LaFADs*)、3个参与合成可溶性糖的基因(*LaBAM1*和*LaSS2*)、19个编码胚胎晚期丰富蛋白的基因(*LaLEAs*)及7个编码过氧化物酶的基因(*LaPODs*), 这些基因在低温胁迫下均上调表达, 指导薰衣草合成并积累保护物质, 维持膜稳定性以应对胁迫。此外, 150 mg·L⁻¹水杨酸预处理能有效缓解植株冻害, 可作为低温保护剂。该研究丰富了薰衣草重要抗逆基因家族的遗传背景, 为后续分子遗传学功能分析和定向品种改良奠定基础。

关键词 薰衣草, 冷害, 冻害, 转录组学分析, 胚胎发育晚期丰富蛋白

蔺海娇, 曲嘉琪, 刘祎男, 苑泽宁 (2022). 薰衣草叶片对低温胁迫的生理与分子响应机制. 植物学报 57, 611–622.

低温胁迫分为冷胁迫(>0°C)和冻胁迫(<0°C), 限制着植物的生存、生长及生产能力(Guo et al., 2018; Liu et al., 2018; Ding et al., 2020)。但植物生长的固着性使其难以逃离逆境, 因此许多植物进化出的表型可塑性有助于其调整自身以适应不断变化的环境(Barrero-Gil and Salinas, 2018)。在植物适应低温胁迫的生理和分子机制中, 最主要的是冷驯化(cold acclimation, CA) (Ding et al., 2019)。冷驯化过程中有大量耐寒相关基因被诱导表达, 如多种脂肪酸去饱和酶(fatty acid desaturase, FAD)基因、甘油-3-磷酸转移酶(glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT)基因、β淀粉酶1(β-amylase 1, BAM1)基因、蔗糖合酶2(sucrose synthase 2, SS2)基因以及胚胎发育晚期丰富蛋白(late embryogenesis abundant protein, LEA)基因和过氧化物酶(peroxidase, POD)基因, 涉及多种结构和代谢变化, 包括调整膜成分以抵御低温损伤、积累与应激相关的蛋白质和糖等渗透性调节物质以避免脱水, 及激活抗氧化酶等(John et al., 2016; Barrero-Gil and Salinas, 2018; Wu et al., 2019)。

Guy等(1985)研究发现, 冷驯化过程中的基因表达受转录控制, 此后越来越多的转录组学研究验证了这一观点。因此, 植物从感知低温到功能基因的表达, 进而抵御低温胁迫的相关调控机制一直是植物学领域的研究热点(段志坤等, 2018)。植株在经过前期适度的逆境处理后, 当再次遭受相同或不同胁迫时会表现出更强的抗性(王笑等, 2021)。植物激素作为受低温胁迫诱导的短期记忆因子, 在冷驯化过程中迅速发挥积极作用, 调控相关基因的表达及一系列生理生化过程以抵御低温(Chinnusamy and Zhu, 2009)。Ryals等(1996)发现水杨酸(SA)在植物获得性系统抗性(system acquired resistance, SAR)过程中发挥至关重要的作用, 是一种必需的植物防御激素, 参与各种逆境保护(Ignatenko et al., 2019; Peng et al., 2021)。此外, 研究发现SA可促进冷驯化, 通过减轻细胞膜损伤、积累渗透性调节物质和激活抗氧化酶活性, 进而提高植物的耐寒性(Wang et al., 2018; Ignatenko et al., 2019; Duan et al., 2022)。

薰衣草(*Lavandula angustifolia*)既是一种名贵的

收稿日期: 2022-03-10; 接受日期: 2022-05-30

基金项目: 哈尔滨师范大学研究生创新科研项目(No.HSDSSCX2021-02)

* 通讯作者。E-mail: xiaoyuan168ok@163.com

药用观赏性植物,也是具代表性的芳香植物(AI-Ansari et al., 2021; Li et al., 2021)。目前,关于薰衣草非生物胁迫的研究主要集中在干旱和盐胁迫,薰衣草能较好地适应干旱缺水条件,并对盐胁迫有一定的耐受性,因此其具有在非生物胁迫条件下种植和扩繁的潜力(Chrysargyris et al., 2016, 2018; Du and Rennenberg, 2018; Paraskevopoulou et al., 2020; Szekely-Varga et al., 2020)。而低温是限制薰衣草在北方寒冷地区种植的非生物胁迫因子之一,国内外针对薰衣草响应低温胁迫的研究尚处于初始阶段。本研究组利用前期获得的1个耐低温薰衣草品种,通过转录组测序(RNA-seq)技术及生物信息学分析方法,揭示薰衣草响应低温胁迫的分子调控机制,挖掘耐寒相关功能基因,以为薰衣草抗寒育种提供重要的理论支撑,为生产实践提供指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料及处理

1.1.1 冷胁迫处理

选取长势良好的薰衣草(*Lavandula angustifolia* Mill.)苗木Haxun-Y-1,在12小时光照/12小时黑暗、相对湿度为70%的人工气候箱(RGX250E,天津市泰斯特仪器有限公司)中培养,常温20°C下取样后,缓慢降温至0°C并在培养24小时后再次取样,每次取样0.2 g,设3组平行。所取样品做好标记,迅速放于液氮中冷冻,置于-80°C冰箱中保存,备用。

1.1.2 冻胁迫处理

将冷胁迫后的实验材料恢复室温培养10天,连续3天喷施25 mL不同浓度的水杨酸(50、100、150 mg·L⁻¹ SA),以清水作为对照(CK),0°C预冷15小时后转至-10°C条件下培养,每隔2小时观察1次植株的冻害情况,在植株出现明显冻害时结束实验。取样方法同1.1.1节。

1.2 转录组测序和功能注释

对提取的总RNA样本进行质检,合格后采用Illumina Hi Seq2500系统测序。质控原始读序得到高质量的Clean Data,利用Trinity软件将所有测得序列从头组装,得到拼接后的Unigene,进行基因表达丰度的定量分析。利用Blast、Hmmscan、SignalP和TmHMMP

等工具得到组装结果在UniProt、NT、NR和PFAM等数据库中的注释信息,然后用Trinotate整合得到综合功能注释结果。将测序所得的原始序列数据提交至NCBI的SRA (Sequence Read Archive)数据库(登录号为SUB10367314, PRJNA765132)。

1.3 差异表达基因分析

用log₂(Fold Change) (0°C/20°C)表示基因的表达变化,用DESeq2对差异基因阈值P-value进行校正,计算得出FDR (false discovery rate)。选取|log₂(Fold Change)| ≥ 1且FDR < 0.05的基因作为差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),并对DEGs进行GO功能富集及KEGG通路富集。

对DEGs采用STRING数据库(<https://string-db.org/>)在线绘制蛋白网络互作图,使用MEGA 7软件构建系统进化树。通过MEME在线网站(<http://meme-suite.org/tools/meme>)对保守基序进行预测分析。从NCBI网站获取CDD hitdata文件,利用TBtools软件进行序列可视化,运用在线工具Expasy (<https://web.expasy.org/protparam/>)以及WoLF PSORT (<https://www.genscript.com/tools/wolf-psort>)分析序列的基本理化性质并预测亚细胞定位信息。

1.4 差异表达基因的验证

根据转录组数据分析结果挑选6个DEGs进行实时荧光定量PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)验证,引物设计见表1。采用2^{-ΔΔCT}法计算基因相对表达量。

1.5 生理指标的测定

利用便携式电导率仪(DDBJ-350F,上海仪电科学仪器股份有限公司),采用浸泡法测定薰衣草叶片相对电导率(relative electrical conductivity, REC)。丙二醛(malondialdehyde, MDA)、可溶性糖(soluble sugars, SS)和可溶性蛋白(soluble proteins, SP)含量及过氧化物酶(peroxidase, POD)活性分别采用检测试剂盒测定(苏州科铭生物技术有限公司)。

1.6 冷害指数的评定

通过观察薰衣草植株的生长状态,根据表2判定冷害级数,计算冷害指数。

表1 qRT-PCR反应所用引物

Table 1 Primers used for qRT-PCR

Gene ID	Gene name	Primer sequence (5'-3')	
DN12834_c2_g2	<i>LaLEA1</i>	F: CCAAGGCAATCTCTGCTCTCA	R: CTTTGGATCCGGAGCCTTTCT
DN11187_c0_g4	<i>LaLEA2</i>	F: TCTACGTCTTCATCTTCGCCG	R: GCGTTGTAGTTTCCAGAGTG
DN10094_c0_g1	<i>LaERD10</i>	F: ATATGACGACGCACCGACTG	R: TCCGGTGCCTAATCCGAATC
DN14123_c1_g1	<i>LaFAB2</i>	F: CGACTTTTGTCTCCCACGGA	R: TGTCCCATCTGGGTCGATCT
DN16955_c0_g1	<i>LaPOD2</i>	F: CATGGACTATGTCACGCCGA	R: GCTCGAAGAAAGCAATGGCA
DN18853_c0_g2	<i>LaBAM1</i>	F: CCCACGGCGAGAGAATTGTA	R: TTTGAGCGATGGGGACGTAG
	<i>GADPH</i>	F: TAGGAGGTGGCAGGACATCA	R: CCCTTTACCCGTCACGTTGT

表2 植物冷害的症状分级

Table 2 Symptoms grading of plant chilling injury

Levels of chilling injury	Standard of judgment
1	Leaf present green and there are no symptoms of chilling injury
2	Only the edge of the leaf is yellow
3	Leaf withered and yellow part of < 50%, the green part is more
4	50%–100% of the leaf is dry and yellow, with less green
5	The whole plant is wilting
6	The aboveground parts dried up and died

冷害指数=(1×S1+2×S2+3×S3+4×S4+5×S5+6×S6)/(总株数×5)

式中, S表示每一冷害级数的苗数。

2 结果与讨论

2.1 数据整体评估及基因功能注释

通过对20°C和0°C处理的6个薰衣草叶片样品进行转录组测序, 共获得38.3 Gb的Clean Data, Q30碱基百分比为93.25%及以上。组装后共获得76 753个Unigene, 其中长度在1 kb以上的有35 787个。对组装获得的Unigene进行功能注释(表3), 共获得50 457个Unigene注释结果, 其中有96.23%在NR数据库中被注释到, 占全部Unigene的63.26%, 在KEGG数据库中被注释到的基因数量最少。

2.2 差异表达基因的筛选与富集

在0°C处理下的薰衣草中共筛选到8 892个DEGs, 其中4 809个DEGs上调, 4 083个DEGs下调, 整体呈上调趋势以响应低温胁迫; 且与20°C处理下的薰衣草相比, 上调基因的变化倍数更大且P值更小(图1)。

表3 基因功能注释结果统计

Table 3 The statistical result of unigene functional annotation

Database	Number of annotated unigene	Percentage of annotated unigene (%)
NT	32797	42.73
NR	48554	63.26
Uniprot (BLASTX)	37801	49.25
Uniprot (BLASTP)	25631	33.39
PFAM	22340	29.11
eggNOG	28488	37.12
GO	24430	31.83
KEGG	15496	20.19
KOG	28787	37.51

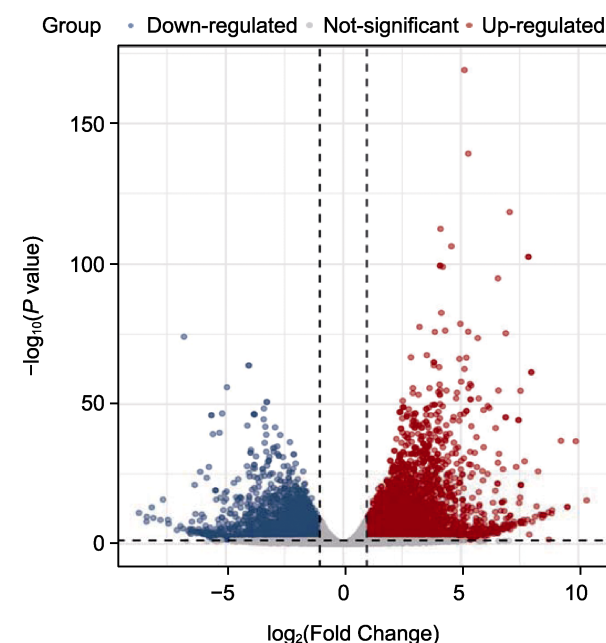


图1 低温胁迫下薰衣草叶片的DEGs火山图(0°C vs 20°C)

Figure 1 DEGs volcano map of *Lavandula angustifolia* leaves under low-temperature stress (0°C vs 20°C)

低温胁迫下薰衣草叶片中的DEGs被GO数据库富集到与转录、防御、响应以及信号等生物学过程 (biological process, BP) 相关; 分子功能 (molecular function, MF) 涉及DNA结合、Ca²⁺结合及蛋白激酶和氧化还原酶活性等; 细胞组分 (cellular component, CC) 主要为膜的组成成分, 以及细胞核、细胞质和叶绿体等的成分。薰衣草叶片DEGs在KEGG数据库中主要被富集到植物激素信号转导、植物-病原体互作、淀粉和蔗糖代谢及苯丙素生物合成等通路(图2)。

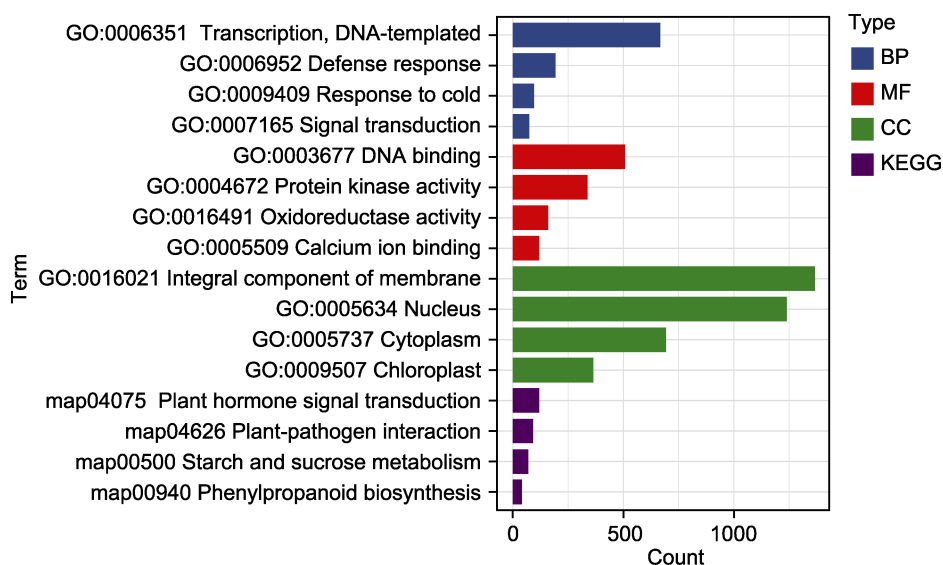


图2 低温胁迫下薰衣草叶片DEGs的GO与KEGG富集情况(0°C vs 20°C)

BP: 生物学过程; MF: 分子功能; CC: 细胞组分

Figure 2 GO and KEGG enrichment of DEGs in *Lavandula angustifolia* leaves under low-temperature stress (0°C vs 20°C)

BP: Biological process; MF: Molecular function; CC: Cellular component

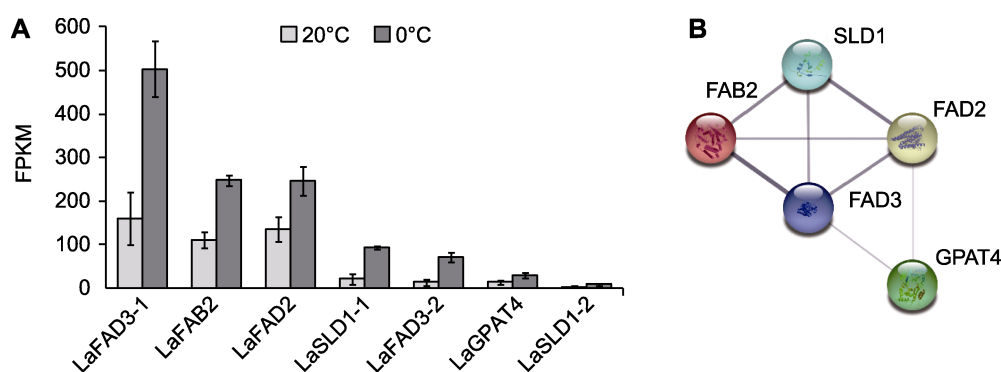


图3 薰衣草膜稳定性相关耐寒基因表达的变化及编码蛋白的互作关系

(A) 基因表达的变化(0°C vs 20°C); (B) 蛋白网络互作。FPKM: 每千个碱基的转录每百万映射读取的片段

Figure 3 Changes in expression of cold tolerance genes related to membrane stability of *Lavandula angustifolia* and the interaction network of these encoding proteins

(A) Gene expression changes (0°C vs 20°C); (B) Protein interaction network. FPKM: Fragments per kilobase per million mapped fragments

酶($\Delta(8)$ -fatty-acid desaturase); *LaGPAT4*编码甘油-3-磷酸2-O-酰基转移酶4 (glycerol-3-phosphate 2-O-acyltransferase 4), 这些基因均在低温胁迫下显著上调表达, 提高了薰衣草叶片中不饱和脂肪酸的比例, 进而增强膜的流动性和稳定性, 提高薰衣草的抗寒性。

对膜稳定性相关蛋白FAB2、FAD2、FAD3、SLD1和GPAT4在薰衣草近缘物种拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 数据库中在线绘制蛋白网络互作图(5种颜色的球体分别代表5种蛋白, 连接线的粗细表示互作关系的强弱) (图3B), 表明4种脂肪酸去饱和酶间有较弱的互作关系, 但其中只有FAD2和FAD3与GPAT4有微弱的联系。

2.4 渗透调节相关DEGs

*LaBAM1-1-2*编码的 β 淀粉酶1 (β -amylase 1, chloro-

plastic)参与薰衣草淀粉的分解, *LaSS2*编码的蔗糖合酶2 (sucrose synthase 2)参与薰衣草蔗糖的合成与分解, 这3个酶基因均在低温处理下显著上调表达并被富集到KEGG数据库中的淀粉和蔗糖代谢通路, 调节薰衣草叶片可溶性糖的整体水平, 以响应低温胁迫。

薰衣草中编码胚胎晚期丰富蛋白(late embryogenesis abundant protein, LEA)家族的基因有23个, 编号为*LaLEA1-23*。其中, *LaLEA23*被注释为脱水蛋白, 因此命名为*LaERD10*。将23个*LaLEAs*与近缘物种拟南芥等进行系统进化树及保守结构域与基序分析, 结果显示*LaLEAs*中含有10个保守基序(图4)。根据保守结构域(conserved domains, CDD)分析, 23个*LaLEAs*中有12个分属于LEA_1、LEA_2、LEA_3、LEA_4、SMP和Dehydrin六个亚族, 其中LEA_1亚族成员有*LaLEA12*; LAE_2亚族成员有*LaLEA4*、

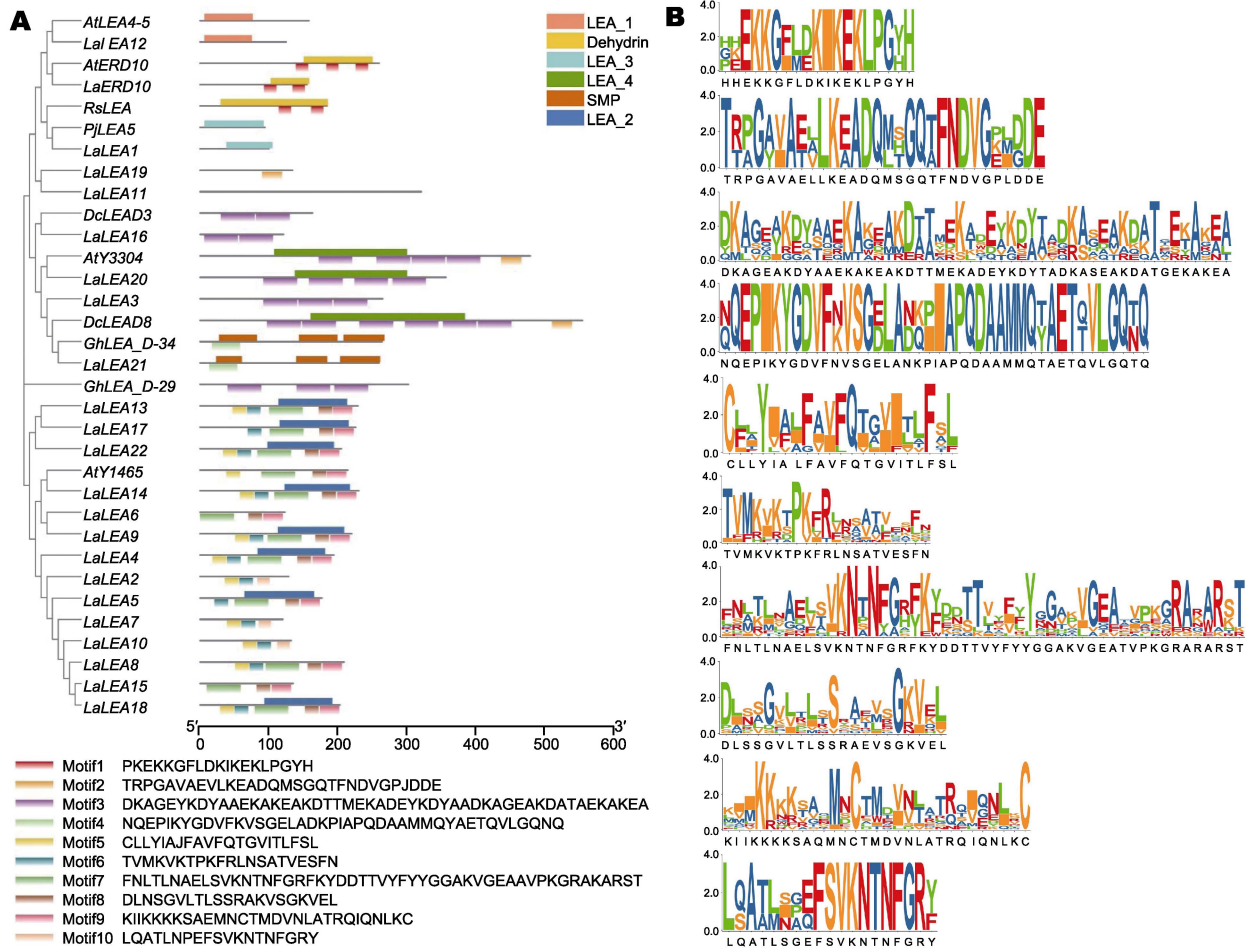


图4 薰衣草与近缘物种LEA的进化树和保守基序分布(A)及seq LOGO (B)

Figure 4 The phylogenetic tree, conservative motif distribution (A) and seq LOGO (B) of LEA proteins in *Lavandula angustifolia* and related species

LaLEA5、*LaLEA9*、*LaLEA13*、*LaLEA14*、*LaLEA17*、*LaLEA18*和*LaLEA22*; LAE_3亚族成员有*LaLEA1*; LEA_4亚族成员仅有*LaLEA20*; SMP亚族成员仅有*LaLEA21*; Dehydrin亚族成员有*LaERD10*。这6个亚族成员与未分类的基因含有相同或相似的保守基序及排列顺序。Motif1只存在于*LaERD10*中, Motif2只存在于*LaLEA19*中, Motif3存在于*LaLEA3*、*LaLEA16*以及*LaLEA20*中, 而Motif4只存在于*LaLEA21*中。*LaLEA4*、*LaLEA8*、*LaLEA9*、*LaLEA13*、*LaLEA14*、*LaLEA17*、*LaLEA18*和*LaLEA22*含有相同的Motif基序与排布, 5'-3'方向依次排列着Motif 5-9五个基序。*LaLEA2*、*LaLEA7*和*LaLEA10*含有相同的Motif基序与排布, 5'-3'方向依次排列着Motif5、Motif6和Motif10。

薰衣草LEA蛋白的长度介于100 (*LaLEA1*)-356

(*LaLEA20*)个氨基酸之间, 分子量与氨基酸数目成正比, 为10.9-37.92 kDa, 等电点跨度较大, 介于4.64 (*LaLEA19*)-10.42 (*LaLEA22*)之间, 表明薰衣草LEA从酸性到碱性均有分布(表4)。亲水性平均系数除*LaLEA4*外均为负数, 说明薰衣草LEA整体呈亲水性, *LaLEA4*表现为疏水性。脂肪指数越高表明蛋白的热稳定性越高, *LaLEA17*的热稳定性最高, *LaLEA16*的热稳定性则最低。不稳定指数越低说明稳定性越高, *LaLEA2*、*LaLEA3*、*LaLEA5-8*、*LaLEA10*、*LaLEA12*和*LaLEA15-21*共15个基因具有较好的稳定性。其中, *LaLEA2*、*LaLEA3*、*LaLEA5*、*LaLEA19*和*LaLEA20*主要定位于叶绿体, *LaLEA7*和*LaLEA16*主要定位于细胞核, *LaLEA12*主要定位于线粒体, *LaLEA17*和*LaLEA21*主要定位于细胞质。

表4 薰衣草LaLEAs家族的理化信息

Table 4 Physical and chemical information of LaLEAs of *Lavandula angustifolia*

Gene ID	Gene name	Number of amino acids (aa)	Molecular weight (kDa)	Theoretical pl	Grand average of hydropathicity (GRAVY)	Aliphatic index	Instability index	Subcellular localization
DN12834_c2_g2	<i>LaLEA1</i>	100	10.90	10.32	-0.484	73.40	52.96	-
DN11187_c0_g4	<i>LaLEA2</i>	128	14.16	10.09	-0.088	74.77	22.26	Chloroplasts
DN13720_c1_g4	<i>LaLEA3</i>	264	28.68	5.12	-0.933	59.73	14.27	Chloroplasts
DN9448_c0_g7	<i>LaLEA4</i>	193	21.28	10.13	0.123	92.49	43.01	Chloroplasts
DN10042_c1_g5	<i>LaLEA5</i>	176	19.78	10.52	-0.463	83.01	34.04	Chloroplasts
DN20068_c2_g4	<i>LaLEA6</i>	122	13.28	10.07	-0.204	71.15	35.17	-
DN13618_c0_g1	<i>LaLEA7</i>	120	13.63	9.68	-0.299	61.08	16.35	Nucleus
DN7134_c0_g1	<i>LaLEA8</i>	208	22.93	9.97	-0.062	92.74	28.05	-
DN16104_c0_g1	<i>LaLEA9</i>	219	24.60	9.97	-0.357	72.19	41.89	-
DN9448_c0_g2	<i>LaLEA10</i>	132	14.84	10.06	-0.475	67.42	24.52	-
DN19299_c2_g2	<i>LaLEA11</i>	320	35.11	9.63	-0.674	55.44	89.14	-
DN11058_c1_g6	<i>LaLEA12</i>	124	13.00	8.83	-1.085	41.94	29.73	Mitochondrial
DN17935_c0_g1	<i>LaLEA13</i>	228	25.24	10.37	-0.224	89.74	42.60	-
DN5364_c0_g1	<i>LaLEA14</i>	229	25.76	9.85	-0.035	90.66	40.29	-
DN13618_c0_g3	<i>LaLEA15</i>	134	14.75	10.01	-0.440	64.03	24.39	-
DN24875_c0_g1	<i>LaLEA16</i>	121	12.51	8.78	-1.135	31.98	32.24	Nucleus
DN9962_c0_g1	<i>LaLEA17</i>	225	24.75	9.69	-0.036	98.67	35.53	Cytoplasm
DN10042_c1_g1	<i>LaLEA18</i>	203	22.61	10.07	-0.226	95.02	30.10	-
DN11740_c4_g1	<i>LaLEA19</i>	133	13.80	4.64	-0.514	72.56	19.99	Chloroplasts
DN11740_c4_g1	<i>LaLEA20</i>	356	37.92	5.88	-1.015	52.16	17.85	Chloroplasts
DN4252_c0_g1	<i>LaLEA21</i>	259	26.30	4.89	-0.167	82.43	30.36	Cytoplasm
DN6726_c0_g1	<i>LaLEA22</i>	204	22.22	10.42	-0.135	88.97	40.07	-
DN10094_c0_g1	<i>LaERD10</i>	155	17.51	5.79	-1.632	45.94	48.98	-

将LaBAM1、LaSS2和LaLEAs等编码可溶性糖与蛋白基因的表达量数据进行0-1标准化, 绘制聚类热图(图5), 发现除LaLEA4、LaLEA13、LaLEA17和LaLEA22外的22个DEGs均随温度的降低表达上调。

2.5 抗氧化酶相关DEGs

采用GGtree-MSA软件对薰衣草POD与拟南芥和林烟草(*Nicotiana sylvestris*) POD进行进化树可视化, 右侧圆圈表示LaPODs基因的log₂(Fold Change)(0°C/20°C)值大小(图6)。薰衣草POD与拟南芥和林烟草具有极高的序列相似性和同源性, LaPOD6在20°C下几乎不表达, 在0°C其上调倍数最大, 说明其表达强烈受低温胁迫诱导。

2.6 qRT-PCR验证

从上述膜稳定性、渗透调节及抗氧化酶相关DEGs中选取6个DEGs进行qRT-PCR扩增, 计算0°C处理下其相比于20°C的表达量变化, 并与转录组测序结果进行对比, 2种方法均显示其在0°C下呈上调表达, 说明本研究测序结果具有可靠性(图7)。

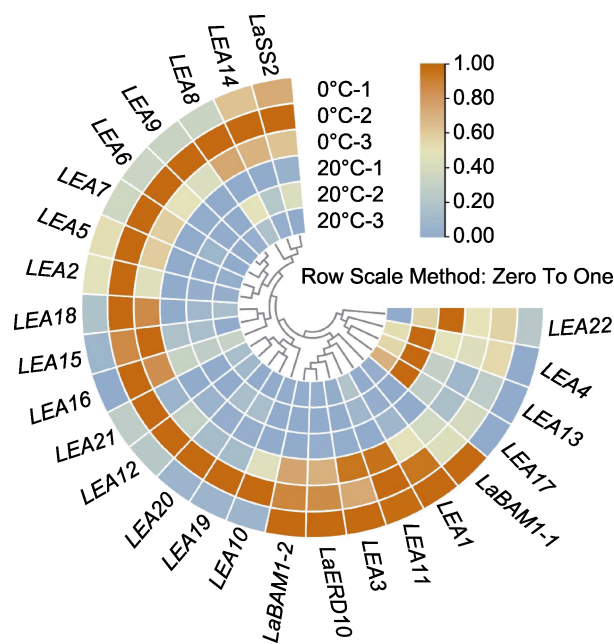


图5 20°C与0°C下薰衣草中编码可溶性糖和蛋白合成基因的聚类图

Figure 5 Cluster diagram of genes encoding soluble sugar and protein synthesis in *Lavandula angustifolia* under 20°C and 0°C

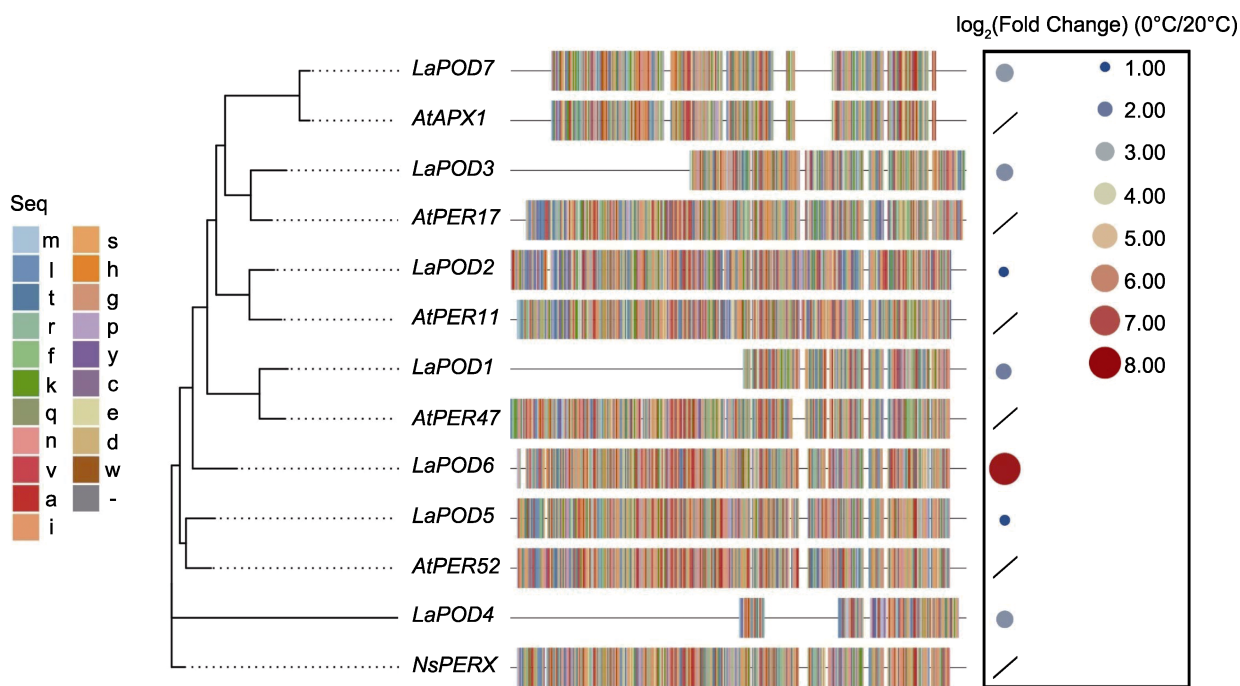


图6 薰衣草与其近缘物种的进化树及其LaPODs在低温胁迫下的表达变化(0°C vs 20°C)

Figure 6 The evolutionary tree of *Lavandula angustifolia* and its relative species, and LaPODs expression changes under low-temperature stress (0°C vs 20°C)

2.7 冷害与冻害条件下薰衣草叶片的生理变化

随着温度的降低,薰衣草叶片REC呈先下降后上升趋势,MDA、SS、SP和POD呈先上升后下降趋势(图8A–E)。外源施加SA使薰衣草叶片渗透调节物质的含量和抗氧化酶活性在-10°C下均有不同程度的升高,且冷害指数上升速度较慢,150 mg·L⁻¹ SA的缓解冻害效果最佳,冷害指数比CK降低约33.33% (图8F)。

2.8 讨论与结论

低温胁迫对植物造成的不利影响主要包括膜系统功能被破坏、细胞脱水和酶活性降低等,抑制生理生化反应(Wang et al., 2021)。耐寒植物在低温胁迫下通

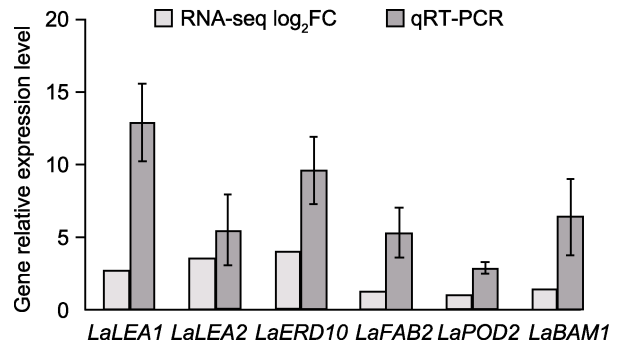


图7 薰衣草耐寒基因在低温胁迫下的表达水平验证(0°C vs 20°C)

Figure 7 Expression of cold tolerance genes in *Lavandula angustifolia* under low-temperature stress (0°C vs 20°C)

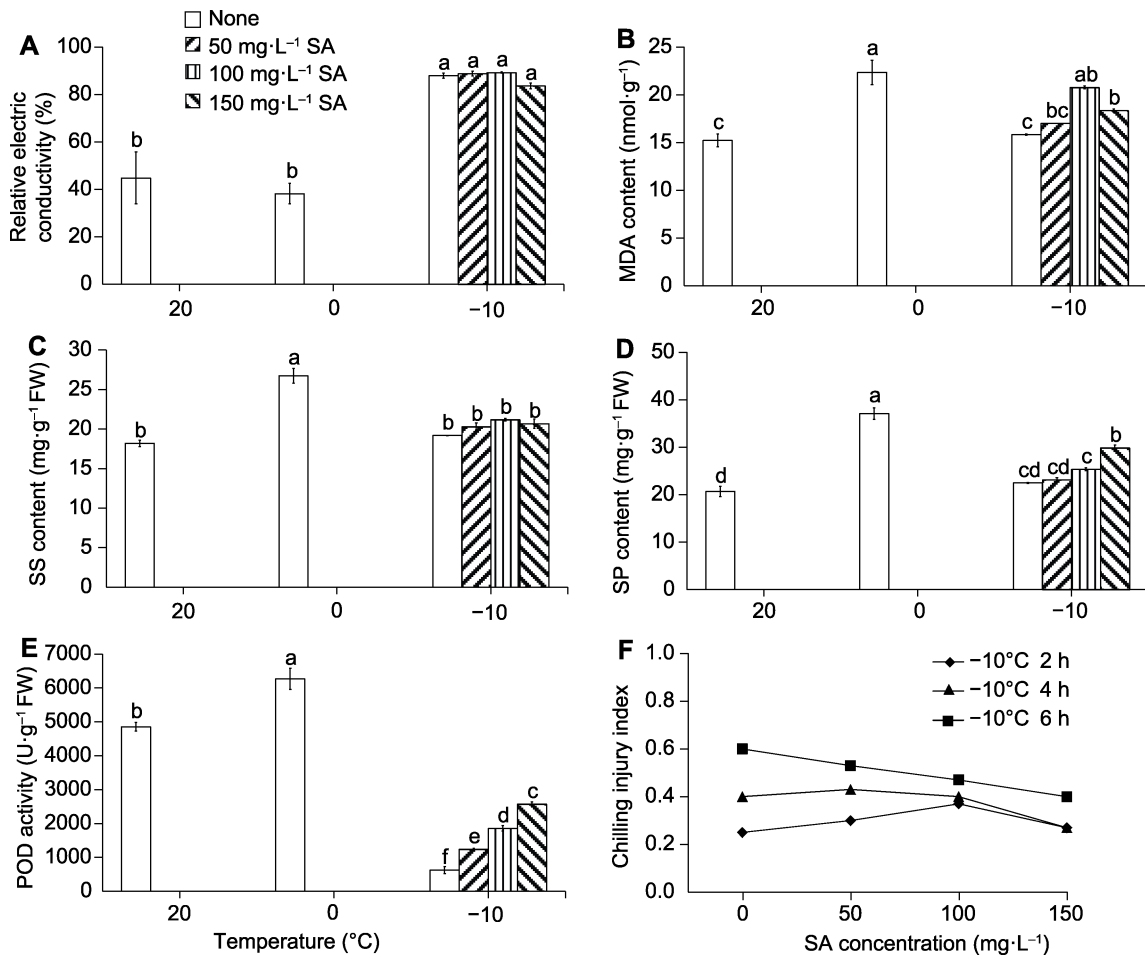


图8 在冷害与冻害条件下薰衣草叶片的生理变化(A–E)及水杨酸(SA)对冻害的缓解效果(F)

MDA: 丙二醛; SS: 可溶性糖; SP: 可溶性蛋白; POD: 过氧化物酶。不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)。

Figure 8 Physiological changes of *Lavandula angustifolia* leaves under chilling and freezing conditions (A–E) and alleviation of freezing injury by salicylic acid (SA) (F)

MDA: Malondialdehyde; SS: Soluble sugars; SP: Soluble proteins; POD: Peroxidase. Different lowercase letters indicate significant differences among different treatments ($P<0.05$).

过分子水平的调节触发化学信号分子变化, 一些直接保护生物大分子和膜结构的功能基因被激活, 诱导未受胁迫的植物组织基因表达, 它们与转录因子和各种激酶等共同组成复杂的分子调控网络, 激活一系列生理生化反应, 指导植物合成各种保护物质以抵御和适应低温环境(图9)。例如, 可溶性糖和蛋白质等发挥渗透调节作用, 过氧化物酶等提高抗氧化水平, 其共同作用使物质和能量代谢平衡, 保护植物免受低温损伤(李瑞雪等, 2019; 代宇佳等, 2019; 何子华等, 2021)。

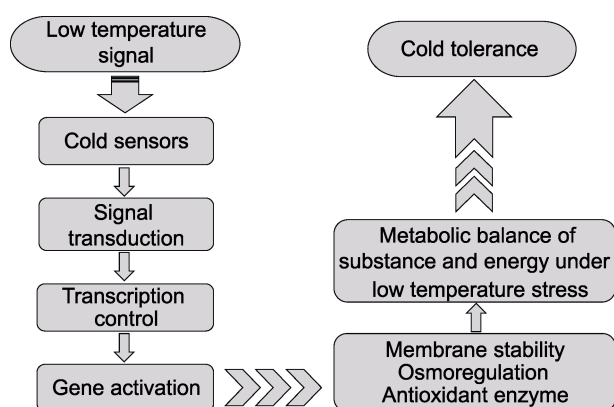


图9 薰衣草叶片响应低温并提高耐寒性途径示意图

Figure 9 Schematic diagram of the way that *Lavandula angustifolia* leaves respond to low temperature and improve cold tolerance

植物经过非冰冻温度的冷驯化后, 会获得抵御冻胁迫的能力, 表现出较强的抗冷性(Ding et al., 2020)。本研究中, 薰衣草经历从20°C到0°C的低温锻炼, 当再次遇到0°C及-10°C低温时会表现出较强的低温适应性(图8)。薰衣草在0°C时积累了大量的SS和SP等渗透调节物质, 它们与POD活性增强协同作用减轻膜损伤, 为后续更低的温度胁迫提供足够的支持。

面对低温植物会通过多种酶的催化来改变膜成分, 增加膜脂不饱和度以保持膜的流动性, 促使植株构建新的平衡, 维持正常的生理功能, 提高低温耐受力(Golizadeh and Kumleh, 2019)。FAB2 (又称SAD) 是唯一的可溶性去饱和酶, 研究发现天山雪莲(*Saussurea involucreta*) SiSAD与拟南芥AtFAB2均可以显著增强烟草(*N. tabacum*)的抗寒性(陈建权等, 2018); 在冷敏感的棉花(*Gossypium hirsutum*)中, Kargiotti-

dou等(2008)发现FAD2在膜对冷应激的适应中发挥直接作用; 低温胁迫下海桐(*Pittosporum tobira*) FAD2上调表达, 积累多不饱和脂肪酸, 从而提高细胞膜的流动性(Zhang et al., 2019); 大豆(*Glycine max*) GmFAD3在拟南芥中过表达可提高植株的耐冷性(张超, 2018), 转GmFAD3A可以改善氧化损伤, 增强水稻(*Oryza sativa*)的耐寒性和低温种子的发芽率(Wang et al., 2019)。Zhou等(2016)通过基因敲减, 发现SISLD对番茄(*Lycopersicon esculentum*)的抗寒性至关重要; ZmGPATs的表达显著受低温诱导, 有助于玉米(*Zea mays*)维持膜的稳定以应对胁迫(Xu et al., 2019); PIGPAT在芍药(*Paeonia lactiflora*)抗寒性的调节中起重要作用(Li et al., 2018)。本研究在0°C处理下的薰衣草叶片中发现7个与膜稳定性相关的上调DEGs (图4), 分别为LaFAB2、LaFAD2、LaFAD3-1、LaFAD3-2、LaSLD1-1、LaSLD1-2和LaGPAT4, 它们协同作用, 提高薰衣草叶片中不饱和脂肪酸的比例, 以增强膜的流动性和稳定性, 从而提高抗寒性。

低温促使植物合成SS、SP及POD等保护性物质, 它们通过参与调节渗透势、维持细胞膜的稳定性和清除活性氧提高对低温胁迫的耐受性。糖在植物冷驯化中起至关重要的作用, Yue等(2015)研究发现糖的积累有助于提高冬季茶树的耐寒性。LEA作为重要的亲水性保护蛋白, 可降低原生质结冰对细胞造成的伤害程度, 在植物抵御低温过程中起主导作用, 其含量对植物的抗寒性非常重要(Pedrosa et al., 2015; Xu et al., 2020)。研究表明, 转MfLEA3可以增强烟草植株对低温胁迫的耐受性(Shi et al., 2020)。POD是细胞内重要的抗氧化酶, Liu等(2021)通过对多倍体草莓(*Fragaria ananassa*)进行加权基因共表达网络分析(weighted gene co-expression network analysis, WGCNA), 发现POD作为中枢基因, 在调节高耐寒性的网络中发挥重要作用。本研究发现, 0°C胁迫下参与薰衣草可溶性糖合成的LaBAM1-1、LaBAM1-2和LaSS2显著上调表达。LaLEAs家族23个成员中有19个显著上调表达(图5), 7个LaPODs与拟南芥和烟草等具有极高的序列相似性与同源性, 基因的表达强烈受低温胁迫诱导(图6)。这些基因为低温环境下的薰衣草提供渗透保护和抗氧化作用, 以减轻低温胁迫造成的损伤。此外, 本研究通过对冷驯化后的薰衣草施加外源SA, 发现SA参与低温锻炼诱导的抗氧化和渗透

调控过程,可有效抵御冷冻胁迫,且 $150\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SA对冻害缓解效果最佳(图8)。研究结果为SA提高薰衣草抗冻性提供了重要的生理依据,但分子层面的调控机制仍有待进一步探索。

本研究通过对薰衣草进行冷驯化处理,诱导并增强其低温耐受性,从生理和分子水平揭示了其耐寒机制。利用转录组测序技术,获得薰衣草叶片中基因转录物在低温胁迫下的丰度,以DEGs为背景,结合生物信息学方法,找到并分析对薰衣草耐寒性获得起关键调控作用的基因和蛋白。发现薰衣草通过激活LaFADs、LaGPAT、LaBAM1、LaSS2、LaLEAs和LaPODs等相关功能基因的表达,指导脂肪酸去饱和酶及可溶性糖、胚胎晚期丰富蛋白和过氧化物酶等低温保护物质的合成,引发一系列生理响应,增强膜的稳定性,提供渗透保护并提高抗氧化水平,最终增强植株的耐寒性。薰衣草叶片中可溶性糖、蛋白和过氧化物酶水平均随冷驯化而升高,随去冷驯化和恢复生长而降低。此外,施加SA可有效缓解冻害对薰衣草植株造成的不利影响。本研究丰富了薰衣草的遗传背景,对提高品种耐寒性及实际生产均具有重要意义。

参考文献

- 陈建权,程晨,张梦恬,张向前,张尧,王爱英,祝建波 (2018). 天山雪莲*SiSAD*基因与拟南芥*AtFAB2*基因转化烟草的抗寒性分析. 植物学报 **53**, 603–611.
- 代宇佳,罗晓峰,周文冠,陈锋,帅海威,杨文钰,舒凯 (2019). 生物和非生物逆境胁迫下的植物系统信号. 植物学报 **54**, 255–264.
- 段志坤,秦晓惠,朱晓红,宋纯鹏 (2018). 解析植物冷信号转导途径:植物如何感知低温. 植物学报 **53**, 149–153.
- 何子华,杨成行,王沛,包爱科,马清 (2021). 高寒地区6种禾本科牧草对低温胁迫的生理响应及耐寒性评价. 草业科学 **38**, 2019–2028.
- 李瑞雪,金晓玲,胡希军,汪结明,罗峰,张方静 (2019). 低温胁迫下6种木兰科植物的生理响应及抗寒相关基因差异表达. 生态学报 **39**, 2883–2898.
- 王笑,蔡剑,周琴,戴廷波,姜东 (2021). 非生物逆境锻炼提高作物耐逆性的生理机制研究进展. 中国农业科学 **54**, 2287–2301.
- 张超 (2018). 大豆*FAD3*基因的克隆及其功能验证. 硕士论文. 长春: 吉林大学. pp. 41–42.
- Al-Ansari MM, Andeejani AMI, Alnahmi E, AlMalki RH, Masood A, Vijayaraghavan P, Rahman AA, Choi KC (2021). Insecticidal, antimicrobial and antioxidant activities of essential oil from *Lavandula latifolia* L. and its deterrent effects on *Euphoria leucographa*. *Ind Crops Prod* **170**, 113740.
- Barrero-Gil J, Salinas J (2018). Gene regulatory networks mediating cold acclimation: the CBF pathway. In: Iwaya-Inoue M, Sakurai M, Uemura M, eds. *Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation*. Singapore: Springer. pp. 3–22.
- Chinnusamy V, Zhu JK (2009). Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Curr Opin Plant Biol* **12**, 133–139.
- Chrysargyris A, Laoutari S, Litskas VD, Stavriniades MC, Tzortzakis N (2016). Effects of water stress on lavender and sage biomass production, essential oil composition and biocidal properties against *Tetranychus urticae* (Koch). *Sci Hortic* **213**, 96–103.
- Chrysargyris A, Michailidi E, Tzortzakis N (2018). Physiological and biochemical responses of *Lavandula angustifolia* to salinity under mineral foliar application. *Front Plant Sci* **9**, 489.
- Ding YL, Shi YT, Yang SH (2019). Advances and challenges in uncovering cold tolerance regulatory mechanisms in plants. *New Phytol* **222**, 1690–1704.
- Ding YL, Shi YT, Yang SH (2020). Molecular regulation of plant responses to environmental temperatures. *Mol Plant* **13**, 544–564.
- Du B, Rennenberg H (2018). Physiological responses of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) to water deficit and recovery. *S Afr J Bot* **119**, 212–218.
- Duan XJ, Zhu ZL, Yang Y, Duan J, Jia ZK, Chen FJ, Sang ZY, Ma LY (2022). Salicylic acid regulates sugar metabolism that confers freezing tolerance in *Magnolia wufengensis* during natural cold acclimation. *J Plant Growth Regul* **41**, 227–235.
- Golizadeh F, Kumleh HH (2019). Physiological responses and expression changes of fatty acid metabolism-related genes in wheat (*Triticum aestivum*) under cold stress. *Plant Mol Biol Rep* **37**, 224–236.
- Guo XY, Liu DF, Chong K (2018). Cold signaling in plants: insights into mechanisms and regulation. *J Integr Plant Biol* **60**, 745–756.
- Guy CL, Niemi KJ, Brambl R (1985). Altered gene expression during cold acclimation of spinach. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 3673–3677.

- Ignatenko A, Talanova V, Repkina N, Titov A** (2019). Exogenous salicylic acid treatment induces cold tolerance in wheat through promotion of antioxidant enzyme activity and proline accumulation. *Acta Physiol Plant* **41**, 80.
- John R, Anjum NA, Sopory SK, Akram NA, Ashraf M** (2016). Some key physiological and molecular processes of cold acclimation. *Biol Plant* **60**, 603–618.
- Kargiotidou A, Deli D, Galanopoulou D, Tsaftaris A, Farmaki T** (2008). Low temperature and light regulate *delta 12* fatty acid desaturases (FAD2) at a transcriptional level in cotton (*Gossypium hirsutum*). *J Exp Bot* **59**, 2043–2056.
- Li JR, Wang YM, Dong YM, Zhang WY, Wang D, Bai HT, Li K, Li H, Shi L** (2021). The chromosome-based lavender genome provides new insights into Lamiaceae evolution and terpenoid biosynthesis. *Hortic Res* **8**, 90.
- Li XT, Liu P, Yang PP, Fan CZ, Sun XM** (2018). Characterization of the glycerol-3-phosphate acyltransferase gene and its real-time expression under cold stress in *Paeonia lactiflora* Pall. *PLoS One* **13**, e0202168.
- Liu J, Li JM, Fu CX** (2021). Comparative physiology and transcriptome analysis reveals the regulatory mechanism of genome duplication enhancing cold resistance in *Fragaria nilgerrensis*. *Environ Exp Bot* **188**, 104509.
- Liu JY, Shi YT, Yang SH** (2018). Insights into the regulation of C-repeat binding factors in plant cold signaling. *J Integr Plant Biol* **60**, 780–795.
- Paraskevopoulou AT, Tsarouchas P, Londra PA, Kamoutsis AP** (2020). The effect of irrigation treatment on the growth of lavender species in an extensive green roof system. *Water* **12**, 863.
- Pedrosa AM, de Paula Santos Martins C, Gonçalves LP, Costa MGC** (2015). Late embryogenesis abundant (LEA) constitutes a large and diverse family of proteins involved in development and abiotic stress responses in sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osb.). *PLoS One* **10**, e0145785.
- Peng YJ, Yang JF, Li X, Zhang YL** (2021). Salicylic acid: biosynthesis and signaling. *Annu Rev Plant Biol* **72**, 761–791.
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD** (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**, 1809–1819.
- Shi HF, He XY, Zhao YJ, Lu SY, Guo ZF** (2020). Constitutive expression of a group 3 LEA protein from *Medicago falcata* (MfLEA3) increases cold and drought tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Rep* **39**, 851–860.
- Szekely-Varga Z, González-Orenga S, Cantor M, Jucan D, Boscaiu M, Vicente O** (2020). Effects of drought and salinity on two commercial varieties of *Lavandula angustifolia* Mill. *Plants* **9**, 637.
- Wang WL, Wang X, Huang M, Cai J, Zhou Q, Dai TB, Cao WX, Jiang D** (2018). Hydrogen peroxide and abscisic acid mediate salicylic acid-induced freezing tolerance in wheat. *Front Plant Sci* **9**, 1137.
- Wang X, Yu C, Liu Y, Yang L, Li Y, Yao W, Cai YC, Yan X, Li SB, Cai YH, Li SQ, Peng XJ** (2019). *GmFAD3A*, A ω -3 fatty acid desaturase gene, enhances cold tolerance and seed germination rate under low temperature in rice. *Int J Mol Sci* **20**, 3796.
- Wang Y, Li Y, Wang JH, Xiang Z, Xi PY, Zhao DG** (2021). Physiological changes and differential gene expression of tea plants (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze var. *niaowan-gensis* Q. H. Chen) under cold stress. *DNA Cell Biol* **40**, 906–920.
- Wu QY, He TJ, Liu H, Luo XB, Yin W, Chen EF, Li F** (2019). Cell ultrastructure and physiological changes of potato during cold acclimation. *Can J Plant Sci* **99**, 873–884.
- Xu ML, Tong Q, Wang Y, Wang ZM, Xu GZ, Elias GK, Li SH, Liang ZC** (2020). Transcriptomic analysis of the grapevine *LEA* gene family in response to osmotic and cold stress reveals a key role for *VamDHN3*. *Plant Cell Physiol* **61**, 775–786.
- Xu XX, Yan BW, Zhao Y, Wang F, Zhao XC, He L, Xu JY, Zhao CJ** (2019). Characterization and expression analysis of *GPAT* gene family in maize. *Can J Plant Sci* **99**, 577–588.
- Yue C, Cao HL, Wang L, Zhou YH, Huang YT, Hao XY, Wang YC, Wang B, Yang YJ, Wang XC** (2015). Effects of cold acclimation on sugar metabolism and sugar-related gene expression in tea plant during the winter season. *Plant Mol Biol* **88**, 591–608.
- Zhang ZL, Liu ZH, Song HN, Chen MH, Cheng SP** (2019). Protective role of leaf variegation in *Pittosporum tobira* under low temperature: insights into the physio-biochemical and molecular mechanisms. *Int J Mol Sci* **20**, 4857.
- Zhou Y, Zeng LT, Fu XM, Mei X, Cheng SH, Liao YY, Deng RF, Xu XL, Jiang YM, Duan XW, Susanne B, Yang ZY** (2016). The sphingolipid biosynthetic enzyme Sphingolipid δ 8 desaturase is important for chilling resistance of tomato. *Sci Rep* **6**, 38742.

Physiological and Molecular Response Mechanisms Under Low-temperature Stress in *Lavandula angustifolia* Leaves

Haijiao Lin, Jiaqi Qu, Yinan Liu, Zening Yuan*

Key Laboratory of Aquatic Biodiversity Research of Heilongjiang Provincial, College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025, China

Abstract The growth and reproduction as well as quality and yield of *Lavandula angustifolia*, a valuable aromatic plant, are severely affected by low temperatures. In our previous study, a low-temperature tolerant lavender variety was obtained. This study revealed the physiological and molecular regulatory mechanisms of *L. angustifolia* in response to cold stress. The relevant cold tolerance genes were mined and analyzed using transcriptomic and bioinformatics approaches. The feasibility of external application of salicylic acid to alleviate -10°C freezing stress was also explored. The results showed that seven genes encoding fatty acid desaturases and transferases (*LaFADs*), three genes involved in the synthesis of soluble sugars (*LaBAM1*, *LaSS2*), 19 genes encoding late embryonic abundant proteins (*LaLEAs*), and seven genes encoding peroxidases (*LaPODs*) were found to be up-regulated at low temperatures, directing *L. angustifolia* to synthesize and accumulate protective substances which maintained membrane stability in response to stress. In addition, salicylic acid pretreatment at $150\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ was effective in alleviating freezing damage to plants and could be used as a low-temperature protectant. This study provides a basis for further understanding molecular mechanism of *L. angustifolia* responding to low-temperature stress.

Key words *Lavandula angustifolia*, chilling injury, freezing injury, transcriptomic analysis, late embryogenesis abundant protein (LEA)

Lin HJ, Qu JQ, Liu YN, Yuan ZN (2022). Physiological and molecular response mechanisms under low-temperature stress in *Lavandula angustifolia* leaves. *Chin Bull Bot* **57**, 611–622.

* Author for correspondence. E-mail: xiaoyuan168ok@163.com

(责任编辑: 孙冬花)