

自然越冬过程不同种源天竺桂激素信号转导及转录组分析

崔罗敏^{1,2}, 殷云龙¹, 於朝广¹, 喻方圆², 陶承友³, 芦治国^{1,①}

[1. 江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园) 江苏省植物资源保护与利用重点实验室, 江苏 南京 210014;
2. 南京林业大学林草学院, 江苏 南京 210037; 3. 江苏省肯联建设有限公司, 江苏 南京 210049]

摘要: 以栽培于江苏南京的安徽、河南和浙江 3 个种源的天竺桂(*Cinnamomum japonicum* Siebold)为研究材料,对自然越冬过程其叶片中激素含量和转录组进行分析。结果表明:自然越冬过程河南种源的天竺桂叶片中吲哚乙酸含量显著高于($p < 0.05$)安徽和浙江种源,安徽种源的天竺桂叶片中脱落酸、水杨酸和赤霉素 A1 含量总体显著高于河南和浙江种源。转录组测序共获得 192 466 个 unigene,进行 Nr、Nt、KO、Swiss-Prot、KOG、GO 和 PFAM 7 大数据库的基因功能注释,注释率为 54.4%。差异表达基因筛选、*k-means* 聚类分析和加权基因共表达网络分析(WGCNA)结果表明:植物-病原体互作、淀粉和蔗糖代谢以及植物激素信号转导 3 个关键 KEGG 通路显著富集。脱落酸和水杨酸信号通路是天竺桂应对自然越冬的重要代谢通路,其中脱落酸受体基因(*PYR/PYL*)、蔗糖非发酵激酶基因(*SnRK2*)、脱落酸应答元件结合因子基因(*ABF*)、病程相关基因非表达子 1(*NPR1*)、TGACG 结合模体(TGA)转录因子基因和病程相关基因(*PR-1*)具有重要作用。随机挑选 6 个差异表达基因的实时荧光定量 PCR 相对表达量与转录组表达量的变化趋势一致。综上所述,3 个种源天竺桂通过特异的激素动态平衡与激素信号通路协同调控适应自然越冬,其中河南种源表现出更强的抗寒代谢调控能力。

关键词: 天竺桂; 自然越冬; 植物激素; 抗寒性; 转录组; 加权基因共表达网络分析(WGCNA)

中图分类号: Q78; Q945.78; S722 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2026)01-0025-11
DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2026.01.03

Analyses of hormone signal transduction and transcriptome in *Cinnamomum japonicum* from different provenances during natural overwintering process CUI Luomin^{1,2}, YIN Yunlong¹, YU Chaoguang¹, YU Fangyuan², TAO Chengyou³, LU Zhiguo^{1,①} [1. Jiangsu Key Laboratory for Conservation and Utilization of Plant Resources, Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences (Nanjing Botanical Garden Mem. Sun Yat-Sen), Nanjing 210014, China; 2. College of Forestry and Grassland, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 3. Jiangsu Kenlian Construction Co., Ltd., Nanjing 210049, China], *J. Plant Resour. & Environ.*, 2026, 35(1): 25-35, 47

Abstract: Taking three *Cinnamomum japonicum* Siebold provenances from Anhui, Henan, and Zhejiang, which cultivated in Nanjing of Jiangsu were selected as research materials, the hormone content and transcriptome of their leaves during natural overwintering process were analyzed. The results indicate that the indole-3-acetic acid content in the leaves of *C. japonicum* from Henan provenance is significantly higher ($p < 0.05$) than that of Anhui and Zhejiang provenances, moreover the abscisic acid, salicylic acid, and gibberellin A1 contents in the leaves of *C. japonicum* from Anhui provenance are significantly

收稿日期: 2025-06-19

基金项目: 江苏省林业科技创新与推广项目(LYKJ[2020]24)

作者简介: 崔罗敏(1994—),男,江西赣州人,博士研究生,主要从事园林植物与观赏园艺方面的研究。

①通信作者 E-mail: lzgjs@cnbg.net

引用格式: 崔罗敏, 殷云龙, 於朝广, 等. 自然越冬过程不同种源天竺桂激素信号转导及转录组分析[J]. 植物资源与环境学报, 2026, 35(1): 25-35, 47.

higher than those of Henan and Zhejiang provenances during natural overwintering process in general. A total of 192 466 unigenes obtained from transcriptome sequencing are performed functional annotation using seven major databases, including Nr, Nt, KO, Swiss-Prot, KOG, GO, and PFAM, achieving an annotation rate of 54.4%. The results of differentially expressed gene screening, *k-means* clustering analysis, and weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) indicate that three key KEGG pathways of plant-pathogen interaction, starch and sucrose metabolism, and plant hormone signal transduction are significantly enriched. The abscisic acid and salicylic acid signaling pathways are important metabolic pathways for *C. japonicum* to cope with natural overwintering. Among them, abscisic acid receptor gene (*PYR/PYL*), sucrose non-fermenting kinase gene (*SnRK2*), abscisic acid-responsive element binding factor gene (*ABF*), non-expressor of pathogenesis-related gene 1 (*NPR1*), TGACG motif-binding (TGA) transcription factor gene, and pathogenesis-related gene (*PR-1*) play important roles. The relative expression levels of six randomly selected differentially expressed genes measured by real-time fluorescence quantitative PCR are consistent with the trends of transcriptome expression levels. In summary, three provenances of *C. japonicum* adapt to natural overwintering through a coordinated regulation of specific hormone dynamic balance and hormone signaling pathways, with the Henan provenance exhibiting a stronger capacity for cold resistance metabolic regulation.

Key words: *Cinnamomum japonicum* Siebold; natural overwintering; plant hormone; cold resistance; transcriptome; weighted gene co-expression network analysis (WGCNA)

天竺桂 (*Cinnamomum japonicum* Siebold) 为樟科 (Lauraceae) 桂属 (*Cinnamomum* Schaeff.) 常绿阔叶乔木, 分布于中国江苏、浙江、安徽、河南、江西、福建及台湾等地, 朝鲜和日本亦有分布^[1]。天竺桂具有较强的适应性和抗逆性, 园林应用价值较高^[2]。此外, 天竺桂的叶和皮不仅可用作香料, 还具有较高的药用价值^[3-5]。目前, 关于天竺桂的研究主要集中在保护生物学^[6]、栽培应用^[7]、遗传多样性^[1,8]、植物化学^[9]等方面, 然而结合生理生化和转录组学的系统性研究仍较缺乏, 这在很大程度上限制了对耐寒机制的深入解析。冷胁迫不仅制约植被的空间分布格局, 还对植物的生长发育产生不利影响^[10-13]。冷胁迫可分为低温 (0~15 °C) 和冷冻 (低于 0 °C) 2 类^[14]。低温主要通过抑制植物细胞内酶活性与关键代谢过程及影响细胞生理, 最终导致代谢失衡和氧化应激^[15-16]。为了应对冷胁迫, 植物进化出多种适应性反应, 包括积累渗透调节物质来维持细胞渗透平衡^[17], 激活抗氧化酶系统^[18-20], 以及调节激素水平^[21]等。

转录组学技术已成为研究植物响应冷胁迫的关键技术, 在分析基因表达模式、挖掘关键基因、阐明调控网络及揭示分子机制等方面取得了突出进展^[21-22]。转录组学已广泛应用于芍药 (*Paeonia lactiflora* Pall.)^[14]、乐东拟单性木兰 [*Parakmeria lotungensis* (Chun et C. H. Tsoong) Y. W. Law]^[22]、杜鹃属 (*Rhododendron* Linn.) 植物^[12,21] 和西瓜 [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai]^[23] 等植物的低温

响应机制研究中。目前已经挖掘出数百个参与植物冷胁迫响应的关键基因, 如 *HY5s* (*elongated hypocotyl 5s*)、*BBXs* (*B-BOXs*)、*CRY1* (*cryptochrome 1*) 和 *PIF3s* (*phytochrome-interacting factor 3s*) 等基因在杜鹃属植物响应冷胁迫过程中起着关键的调控作用^[21]。此外, 多个转录因子已被证明参与植物对冷胁迫的响应, 如水稻 (*Oryza sativa* Linn.) 中的 AP2/ERF (APETALA2/ethylene responsive factor) 和 MYB (*myeloblastosis*)^[24-25]、牡丹 (*Paeonia* × *suffruticosa* Andrews) 中的 MYB^[10] 以及拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] 中的 CBF (C-repeat binding factor)^[26]。

天竺桂为耐寒性较强的常绿阔叶树种, 通过比较不同种源天竺桂在冷胁迫后的叶片含水量发现, 河南种源的耐寒性最强, 其叶片可以耐受 -20 °C 的低温^[19]。为进一步研究天竺桂的抗寒机制, 以安徽、河南和浙江种源的天竺桂容器苗为研究材料, 在自然越冬条件下对其进行叶片激素含量和转录组学分析, 并通过差异表达基因的功能注释、KEGG 通路分析、加权基因共表达网络分析及表达变化趋势分析等手段筛选天竺桂抗寒相关通路及关键基因, 以期为天竺桂耐寒品种的引种驯化和分子育种提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试天竺桂原产于安徽省霍山县 (A) (北纬

31°20′02″、东经 116°13′44″)、河南省栾川县(H)(北纬 33°43′44″、东经 111°41′29″)和浙江省建德市(Z)(北纬 29°31′18″、东经 119°17′32″),经江苏省中国科学院植物研究所殷云龙研究员鉴定。3 个种源材料种植于江苏省南京市八卦洲(北纬 32°12′28″、东经 118°49′20″),株龄 3 a。实验时间为 2024 年 11 月—2025 年 2 月,种植地 2024 年 11 月的最低温度为 -0.1 ℃、最高温度为 26.5 ℃、平均温度为 12.6 ℃;2025 年 1 月的最低温度为 -8.2 ℃、最高温度为 17.4 ℃、平均温度为 3.9 ℃;2025 年 2 月的最低温度为 -10.0 ℃、最高温度为 21.9 ℃、平均温度为 4.7 ℃(数据来源于南京市气象局网站 <http://js.cma.gov.cn/dsjwz/njs/njszfxgk/sjfdzdgknr/sjtjxx/>)。分别于 2024 年 11 月下旬(T1)(平均温度为 8.5 ℃)、2025 年 1 月下旬(T2)(平均温度为 5.1 ℃)和 2025 年 2 月下旬(T3)(平均温度为 6.4 ℃)采集 3 株天竺桂当年生成熟叶,单株混合,即为 3 个生物学重复,液氮冷冻后储存于 -80 ℃ 冰箱,备用。

1.2 方法

1.2.1 内源激素提取及含量测定 采用高效液相色谱-串联质谱法,使用岛津 LC-30AD 高效液相色谱仪(日本岛津株式会社)测定天竺桂叶片的吲哚乙酸(IAA)、脱落酸(ABA)、水杨酸(SA)和赤霉素 A1(GA1)含量。取 200 mg 左右样品,准确称量后加入 2 mL 乙腈(色谱纯),于 4 ℃ 条件下提取,过夜,于 12 000 g 离心 5 min,取上清,沉淀再次加入 1 mL 乙腈,重复操作 1 次,合并上清液。上清液过 C₁₈ 固相萃取柱后剧烈震荡 30 s,于 10 000 g 离心 5 min,取上清液,真空离心浓缩至干燥,加入 200 μL 甲醇(色谱纯)复溶,置于 -20 ℃ 冰箱待上机检测。采用 SCIEX-6500 Qtrap 串联质谱系统(美国 AB 公司)进行质谱分析。Poroshell 120 SB-C18 色谱柱(2.1 mm×150 mm,2.7 μm)(美国 Agilent 公司),柱温为 30 ℃,梯度洗脱,流动相为体积分数 0.1% 甲酸-甲醇溶液和体积分数 0.1% 甲酸-水溶液(体积比为 1:5~5:1),进样量 2 μL。采用标准曲线法,根据回归方程 $y = 423\ 947x + 4\ 334$ ($r = 0.995$) 计算吲哚乙酸含量,根据回归方程 $y = 121\ 351x + 6\ 338$ ($r = 0.998$) 计算脱落酸含量,根据回归方程 $y = 505\ 663x + 205\ 795$ ($r = 0.993$) 计算水杨酸含量,根据回归方程 $y = 19\ 447x + 1\ 910$ ($r = 0.996$) 计算赤霉素 A1 含量。每个样品测定 1 次。

1.2.2 总 RNA 提取 采用 Trizol 试剂(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)提取总 RNA,使用 Agilent 2100 bioanalyzer(美国 Agilent 公司)检测 RNA 完整性和总量。

1.2.3 转录组测序及注释 将 27 个待测样本交由北京诺禾致源生物科技有限公司进行转录组文库和测序,使用 Illumina NovaSeq-PE150 测序平台(美国 Illumina 公司)进行转录组测序。将测序所得的序列拼接成转录本,使用 Corset 程序对转录本进行层次聚类(hierarchical clustering)分析,以聚类后序列为参考,在 Nr、Nt、KO、Swiss-Prot、KOG、GO 和 PFAM 7 个数据库进行基因功能注释。

1.2.4 差异表达基因筛选 利用 DESeq2 软件获得差异表达基因(DEG),筛选阈值为 $p_{\text{adj}} \leq 0.05$ 且 $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$ 。利用 R 语言中的 cor 函数进行样本间的相关性分析,利用 R 语言中的 R-PCA-prcomp 统计函数进行主成分分析(PCA)。以同实验条件下差异表达基因的每千碱基转录本每百万映射读取的片段数(FPKM)为表达水平,进行层次聚类分析,再基于差异表达基因的相对表达水平 $\log_2(\text{ratios})$,利用 R 语言中的 k-means 软件包对差异表达基因进行聚类,分析同一簇中的差异表达基因在不同处理条件下相对表达水平的变化趋势。

1.2.5 加权基因共表达网络分析(WGCNA)及关键基因筛选 结合内源激素含量和转录组测序结果,使用 R 语言的 WGCNA 包进行分析,并对基因模块与耐寒相关性状进行 Pearson 相关性分析。

1.2.6 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 候选基因选择与引物设计 随机选取 6 个表达模式不同的差异表达基因进行 RT-qPCR 分析,这 6 个基因的特异引物见表 1。以 actin 为内参基因(正向引物:5′-TGATGC CAAGGCTGGAATTGC-3′;反向引物 5′-GATCAGGTC AACGACACGAGAG-3′),使用 Applied Biosystems StepOnePlus 实时荧光定量 PCR 系统(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)对 6 个差异表达基因进行 RT-qPCR 验证。按照 2×SYBR Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit(湖南艾科瑞生物工程有限公司)说明书配制 RT-qPCR 反应体系,含 100 ng·μL⁻¹ cDNA 模板 2.0 μL、10 μmol·L⁻¹ 正向和反向引物各 0.4 μL、2×SYBR Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit 10.0 μL,用 ddH₂O 补至 20.0 μL。反应程序:95 ℃ 预变性 10 min;95 ℃ 变性 15 s、60 ℃ 退火 30 s、72 ℃ 延伸 30 s,40 个

表 1 用于实时荧光定量 PCR 的天竺桂候选基因及其引物

Table 1 Candidate genes and their primers for real-time fluorescence quantitative PCR in *Cinnamomum japonicum* Siebold

基因 ID Gene ID	正向引物序列 Forward primer sequence (5'→3')	反向引物序列 Reverser primer sequence (5'→3')
Cluster95477.26933	TGGGCATGGAAGATTGGTCC	GTTGAACCGGTGAAGGCAAC
Cluster95477.36423	CAGTTGAGGGCTACCGCATT	CTTGCCAGTCACTATGGCCT
Cluster95477.35240	TTCTGTTGTGGACCTCGTCG	ACGACACATCAGAGCACCTG
Cluster95477.36951	GGAGTTCACAAGCACGCATC	CCTCCACCACCTTGACATCC
Cluster95477.56249	GTGGGTCATAAGGCCAGACC	AACAGGCACACCAGCACATA
Cluster95477.38974	ATGTTGCATTGCTTGGGCAG	CACGCCATGTATGCCAACTG

循环;60~95 °C 下进行融化过程以产生融化曲线。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法^[27] 对 RT-qPCR 结果进行分析。每个样本 3 次重复。

1.3 数据统计和分析

利用 EXCEL 2016 软件对实验数据进行初步整理,利用 IBM SPSS Statistics 27.0.1 软件进行方差分析,利用 Origin 2021 软件绘制图表,利用 R 4.4.1 和诺禾致源云交付平台处理转录组数据,并利用 TBtools 软件制作热图。

2 结果和分析

2.1 自然越冬过程天竺桂叶片激素含量分析

自然越冬过程 3 个种源天竺桂叶片中激素含量变化见表 2。结果显示:自然越冬过程中,安徽种源天竺桂叶片中吲哚乙酸含量呈上升趋势,而河南和浙江种源总体呈下降趋势;安徽和河南种源天竺桂叶片中脱落酸含量呈上升趋势,而浙江种源则呈下降趋势;安徽种源天竺桂叶片水杨酸含量呈先升后降的趋

势,而河南和浙江种源则呈下降趋势;安徽和河南种源天竺桂叶片赤霉素 A1 含量呈先升后降的趋势,而浙江种源呈下降趋势。同一时间河南种源天竺桂叶片中吲哚乙酸含量显著高于 ($p<0.05$) 安徽和浙江种源;安徽种源天竺桂叶片中脱落酸和水杨酸含量总体显著高于河南和浙江种源;2024 年 11 月下旬浙江种源天竺桂叶片中赤霉素 A1 含量显著高于安徽和河南种源,2025 年 1 月和 2 月安徽种源天竺桂叶片中赤霉素 A1 含量显著高于河南和浙江种源。综上所述,河南种源通过主动调节生长和防御激素,抗寒性最强;安徽种源通过强烈的应激反应也表现出良好的抗寒性;而浙江种源在关键的脱落酸防御反应上表现缺失,抗寒性最弱。

2.2 天竺桂转录组测序数据质控和功能注释

供试天竺桂 27 个样本平均获得约 7×10^6 条 clean read。质量评估结果显示:所有样本的 Q20 值均超过 99%,Q30 值在 96.99%~97.64% 之间,表明测序数据的可靠性较高。通过小提琴图和 FPKM 分布密度图对数据进行可视化,结果显示:相同处理不同样

表 2 自然越冬过程 3 个种源天竺桂叶片中激素含量变化 ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾Table 2 Changes of leaf hormone contents in *Cinnamomum japonicum* Siebold from three provenances during natural overwintering process ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

种源 Provenance	时间 Time	吲哚乙酸含量/(ng·g ⁻¹) Indole-3-acetic acid content	脱落酸含量/(ng·g ⁻¹) Abscisic acid content	水杨酸含量/(ng·g ⁻¹) Salicylic acid content	赤霉素 A1 含量/(ng·g ⁻¹) Gibberellin A1 content
安徽 Anhui	T1	0.432±0.016Bc	255.345±3.991Ba	7.323±0.449Ca	0.075±0.001Cc
	T2	0.821±0.016Ab	547.874±18.002Aa	12.647±0.338Aa	0.338±0.011Aa
	T3	0.846±0.024Ab	550.774±5.417Aa	9.135±0.170Ba	0.191±0.008Ba
河南 Henan	T1	1.377±0.038Aa	116.007±1.535Cb	7.330±0.098Aa	0.094±0.004Bb
	T2	1.345±0.020Aa	177.213±1.841Bb	4.194±0.186Bb	0.138±0.006Ab
	T3	1.033±0.097Ba	276.141±2.760Ab	2.555±0.074Cb	0.068±0.002Cb
浙江 Zhejiang	T1	0.593±0.023Ab	124.691±2.453Ab	4.573±0.328Ab	0.174±0.003Aa
	T2	0.353±0.027Bc	48.770±1.019Bc	2.627±0.157Bc	0.045±0.002Bc
	T3	0.409±0.007Bc	25.427±0.517Cc	2.407±0.175Bb	0.043±0.002Bc

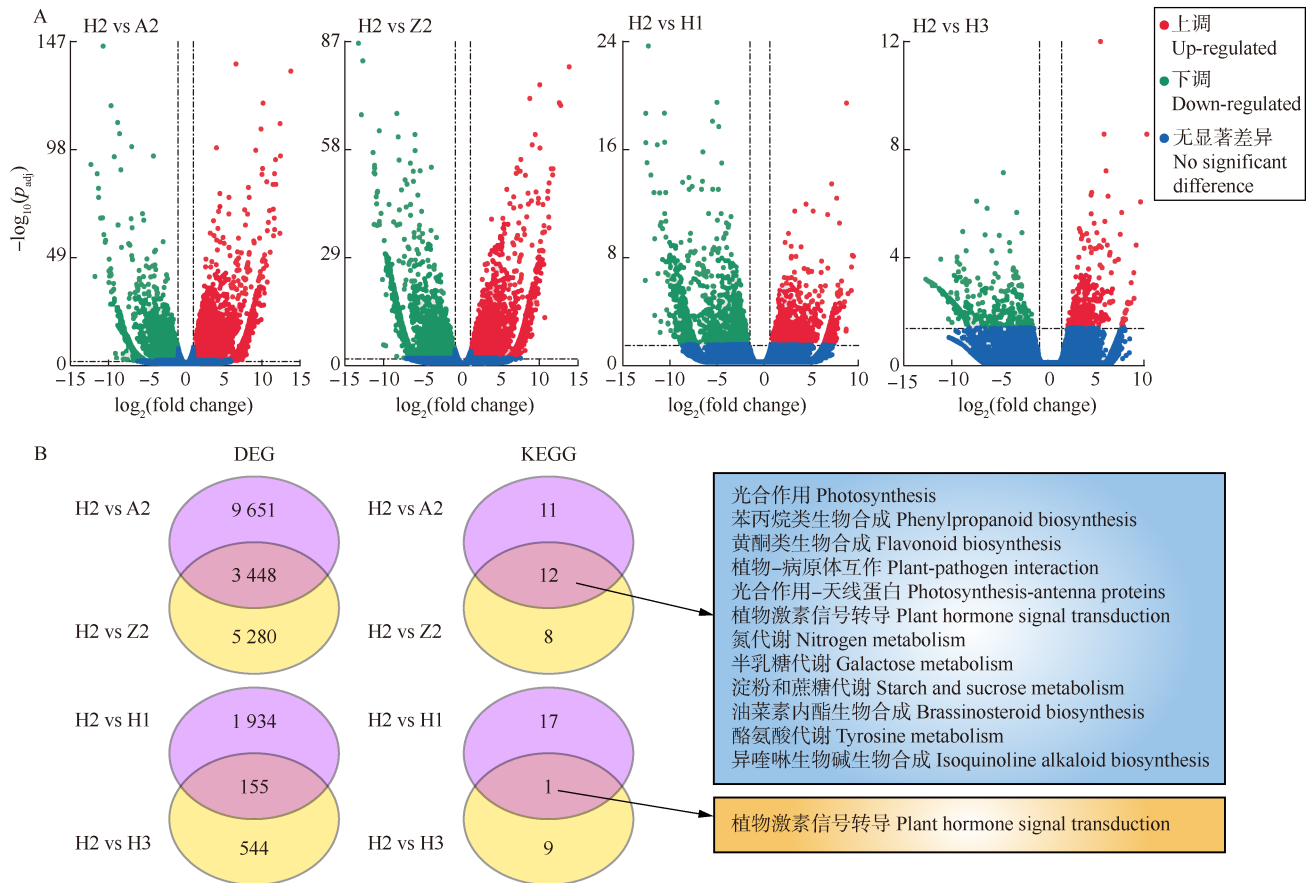
¹⁾ T1: 2024 年 11 月下旬 Late November 2024; T2: 2025 年 1 月下旬 Late January 2025; T3: 2025 年 2 月下旬 Late February 2025。同列中不同大写字母表示同一种源不同时间间差异显著 ($p<0.05$) Different uppercases in the same column indicate the significant differences ($p<0.05$) between different times of the same provenance; 同列中不同小写字母表示同一时间不同种源间差异显著 ($p<0.05$) Different lowercases in the same column indicate the significant differences ($p<0.05$) between different provenances at the same time.

本间的数据具有一致性,表明样本的生物学重复具有一致性。为了降低转录组数据维度以及衡量组内生物学重复的数据表达一致性,对样本进行相关性分析和主成分分析(PCA),同一种源的样本聚集在一起,2025 年 1 月下旬不同种源之间的 PCA 距离最大。从天竺桂转录组数据共获得 192 466 个 unigene。由于天竺桂无参考基因组,在 7 个数据库中至少有 1 种注释的 unigene 有 104 747 个,占比为 54.4%;在 7 个数据库中均有注释的 unigene 有 5 137 个,占比为 2.7%。

2.3 自然越冬过程天竺桂转录水平分析

为了解自然越冬过程不同种源天竺桂在转录水平的变化情况,基于 PCA 结果,以抗寒性较强的河南

种源在 2025 年 1 月下旬的样本(H2)为对照进行差异表达分析,结果(图 1)表明:共鉴定到 19 399 个差异表达基因,且同一时期不同种源之间的差异表达基因明显多于同一种源不同时期的差异表达基因。与 H2 相比较,2025 年 1 月下旬安徽种源(A2)、2025 年 1 月下旬浙江种源(Z2)、2024 年 11 月下旬河南种源(H1)和 2025 年 2 月下旬河南种源(H3)的差异表达基因分别有 13 099(上调 6 002,下调 7 097)、8 728(上调 4 530,下调 4 198)、2 089(上调 1 013,下调 1 076)和 699(上调 342,下调 357)个(图 1-A)。H2 vs A2 组与 H2 vs Z2 组共有 3 448 个相同的差异表达基因和 12 个相同的 KEGG 通路($p < 0.05$),H2 vs H1 组与 H2 vs H3 组共有 155 个相同的差异表达基



A2: T2 时间的安徽种源 Anhui provenance at T2 time; H1, H2, H3; 分别为 T1、T2 和 T3 时间的河南种源 Henan provenances at T1, T2, and T3 times, respectively; Z2: T2 时间的浙江种源 Zhejiang provenance at T2 time. T1: 2024 年 11 月下旬 Late November 2024; T2: 2025 年 1 月下旬 Late January 2025; T3: 2025 年 2 月下旬 Late February 2025.

图 B 左图中数据为 DEG 数量,右图中数据为富集通路数量 The data in the left panel of Figure B represent the number of DEGs, while the data in the right panel represents the number of enriched pathways.

图 1 自然越冬过程 3 个种源天竺桂差异表达基因 (DEG) 的火山图 (A) 和维恩图 (B)
 Fig. 1 Volcano spot (A) and Venn diagram (B) of differentially expressed genes (DEGs) in *Cinnamomum japonicum* Siebold from three provenances during natural overwintering process

因和1个相同的KEGG通路(图1-B)。其中,H2 vs A2组与H2 vs Z2组共有的富集通路有淀粉和蔗糖代谢、植物激素信号转导以及植物-病原体互作等;H2 vs H1组与H2 vs H3组共有的富集通路仅植物激素信号转导。进一步说明植物激素信号转导在天竺桂自然越冬过程中起到了重要的调控作用。

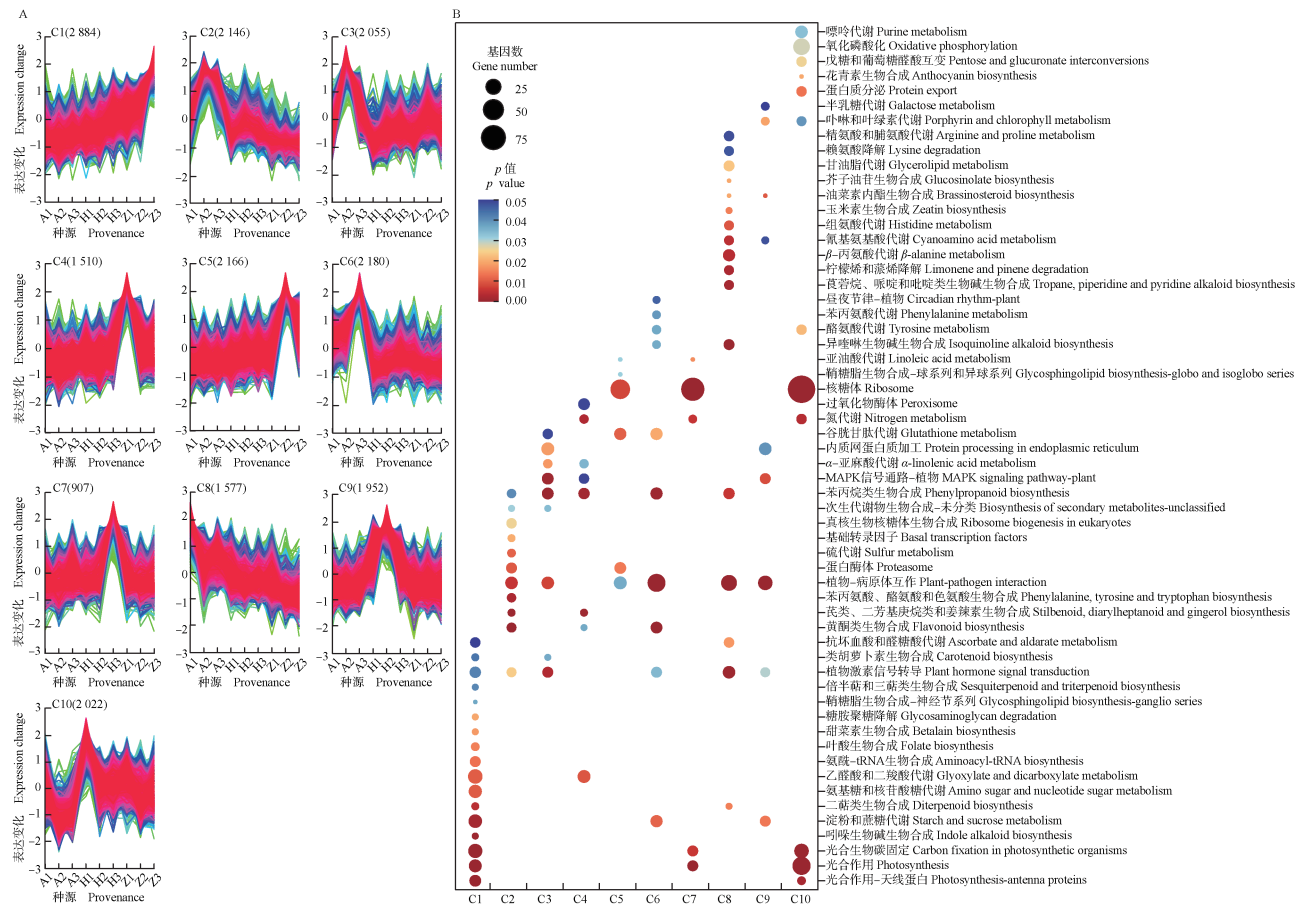
2.4 差异表达基因的 *k-means* 聚类分析

利用 *k-means* 聚类将 19 399 个差异表达基因分成 10 个簇(图 2-A)。其中,C2、C3 和 C6 簇的差异表达基因主要在安徽种源的天竺桂中高表达,这与 C10 簇正好相反。此外,C5 簇中 2025 年 1 月下旬浙江种源表现出显著的表达上调,C9 簇中 2025 年 1 月下旬河南种源表现出显著的表达上调。KEGG 富集

分析结果(图 2-B)显示:C9 簇的差异表达基因主要参与植物抗性和抗氧化相关的通路,包括淀粉和蔗糖代谢、植物激素信号转导、植物-病原体互作和 MAPK 信号通路-植物。表明这些通路在天竺桂自然越冬过程中起着关键作用。

2.5 基于 WGCNA 筛选天竺桂中与自然越冬相关的模块和候选基因

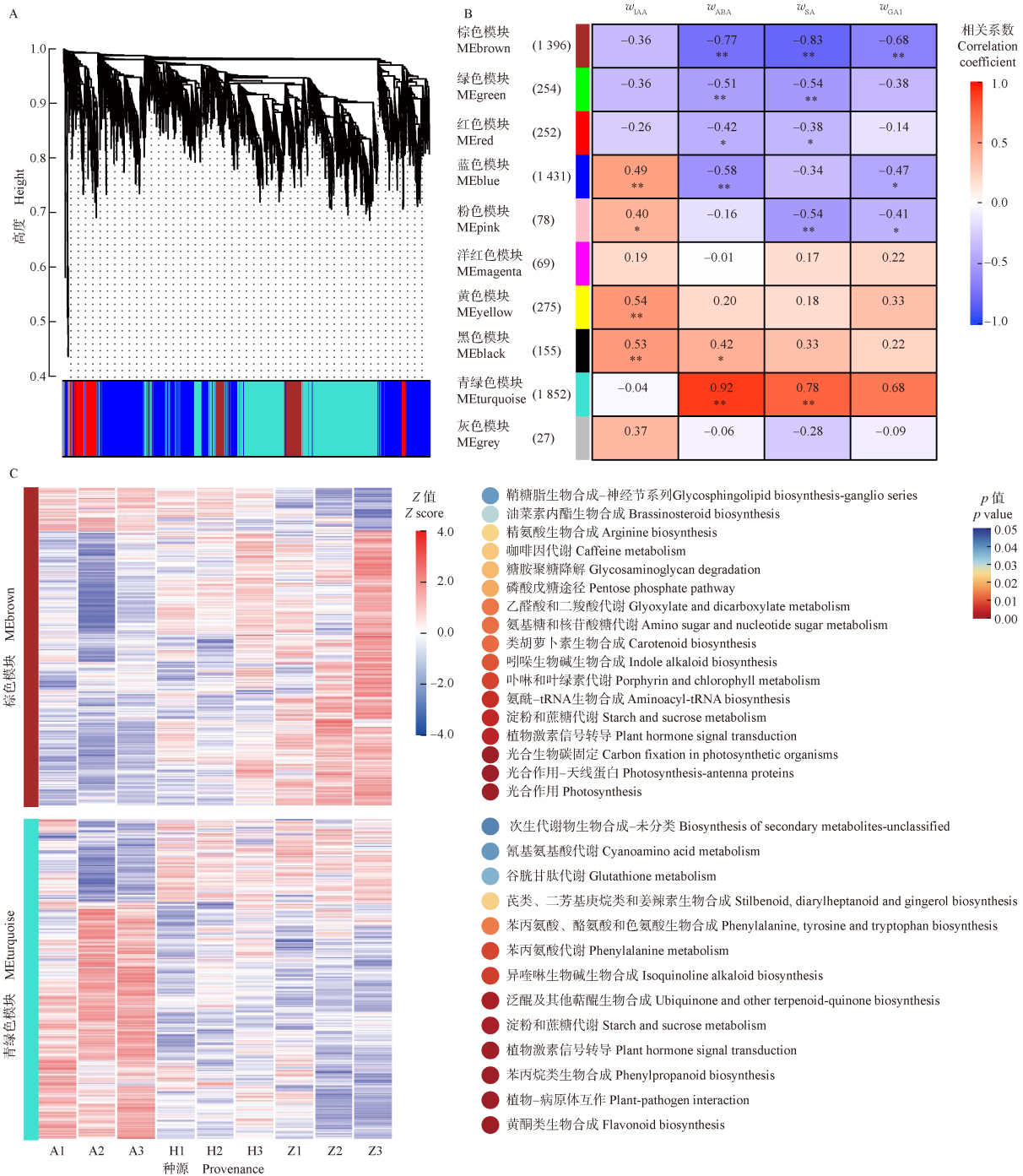
19 399 个差异表达基因与天竺桂叶片中吲哚乙酸、脱落酸、水杨酸和赤霉素 A1 含量的 WGCNA 结果(图 3)显示:获得的 10 个模块的特征基因数在 27~1 852 之间(图 3-B)。吲哚乙酸含量与蓝色、粉色、黄色和黑色模块特征基因的表达量呈显著正相关($p < 0.05$),与其他颜色模块特征基因的表达量无显著相



A1, A2, A3: 分别为 T1、T2 和 T3 时间的安徽种源 Anhui provenances at T1, T2, and T3 times, respectively; H1, H2, H3: 分别为 T1、T2 和 T3 时间的河南种源 Henan provenances at T1, T2, and T3 times, respectively; Z1, Z2, Z3: 分别为 T1、T2 和 T3 时间的浙江种源 Zhejiang provenances at T1, T2, and T3 times, respectively. T1: 2024 年 11 月下旬 Late November 2024; T2: 2025 年 1 月下旬 Late January 2025; T3: 2025 年 2 月下旬 Late February 2025.

图 A 各簇括号中数据为差异表达基因数量 The data within the brackets of each cluster in Figure A represent the number of differentially expressed genes.

图 2 自然越冬过程 3 个种源天竺桂差异表达基因的 *k-means* 聚类分析 (A) 和 KEGG 富集分析 (B) 结果
Fig. 2 Results of *k-means* clustering analysis (A) and KEGG enrichment analysis (B) of differentially expressed genes in *Cinnamomum japonicum* Siebold from three provenances during natural overwintering process



w_{IAA} : 吲哚乙酸含量 Indole-3-acetic acid content; w_{ABA} : 脱落酸含量 Abscisic acid content; w_{SA} : 水杨酸含量 Salicylic acid content; w_{GA1} : 赤霉素 A1 含量 Gibberellin A1 content. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$. A1, A2, A3: 分别为 T1, T2 和 T3 时间的安徽种源 Anhui provenances at T1, T2, and T3 times, respectively; H1, H2, H3: 分别为 T1, T2 和 T3 时间的河南种源 Henan provenances at T1, T2, and T3 times, respectively; Z1, Z2, Z3: 分别为 T1, T2 和 T3 时间的浙江种源 Zhejiang provenances at T1, T2, and T3 times, respectively. T1: 2024 年 11 月下旬 Late November 2024; T2: 2025 年 1 月下旬 Late January 2025; T3: 2025 年 2 月下旬 Late February 2025.

图 B 各模块括号中数据为差异表达基因数量 The data within the brackets of each module in Figure B represent the number of differentially expressed genes. A: 聚类树状图 Cluster dendrogram; B: 模块与激素含量关联图 Association diagram of module and hormone content; C: 棕色和青绿色模块中差异表达基因的表达趋势及 KEGG 通路富集分析 Expression trend of differentially expressed genes and KEGG pathway enrichment analysis in the MEbrown and METurquoise.

图 3 自然越冬过程 3 个种源天竺桂加权基因共表达网络分析图

Fig. 3 Weighted gene co-expression network analysis diagram of *Cinnamomum japonicum* Siebold from three provenances during natural overwintering process

关性。脱落酸含量与棕色、绿色、红色和蓝色模块特征基因的表达量呈显著负相关,与黑色和青绿色模块特征基因的表达量呈显著正相关,其中与青绿色模块特征基因的表达量相关性最强(相关系数为 0.92)。水杨酸含量与棕色、绿色、红色和粉色模块特征基因的表达量呈显著负相关,与青绿色模块特征基因的表达量呈显著正相关,其中与棕色模块特征基因的表达量相关性最强(相关系数为-0.83)。赤霉素 A1 含量与棕色、蓝色和粉色模块特征基因的表达量呈显著负相关,与青绿色模块特征基因的表达量呈显著正相关。选取青绿色模块 1 852 个特征基因和棕色模块 1 396 个特征基因进行基因表达和 KEGG 通路富集分析,结果(图 3-C)显示:棕色模块的特征基因表达在安徽种源中多数下调,在浙江种源中多数上调;棕色模块的特征基因主要富集在光合作用、光合作用-

天线蛋白、光合生物碳固定、植物激素信号转导以及淀粉和蔗糖代谢等通路。青绿色模块的特征基因表达在浙江种源中多数下调,在安徽种源中多数上调,青绿色模块的特征基因则主要富集在黄酮类生物合成、植物-病原体互作、苯丙烷类生物合成、植物激素信号转导以及淀粉和蔗糖代谢等通路。植物激素信号转导以及淀粉和蔗糖代谢是 2 个模块共有通路。

考虑到脱落酸和水杨酸信号通路在天竺桂自然越冬中的核心作用,基于转录组数据绘制天竺桂脱落酸和水杨酸信号传导途径相关差异表达基因的表达模式图(图 4)。在这 2 个通路中,共有 18 个差异表达基因。脱落酸信号通路涉及 3 个脱落酸受体基因(*PYR/PYL*)、1 个磷酸酶基因(*PP2C*)、3 个蔗糖非发酵激酶基因(*SnRK2*)和 4 个脱落酸应答元件结合因子基因(*ABF*);水杨酸信号通路包含 2 个病程相关基

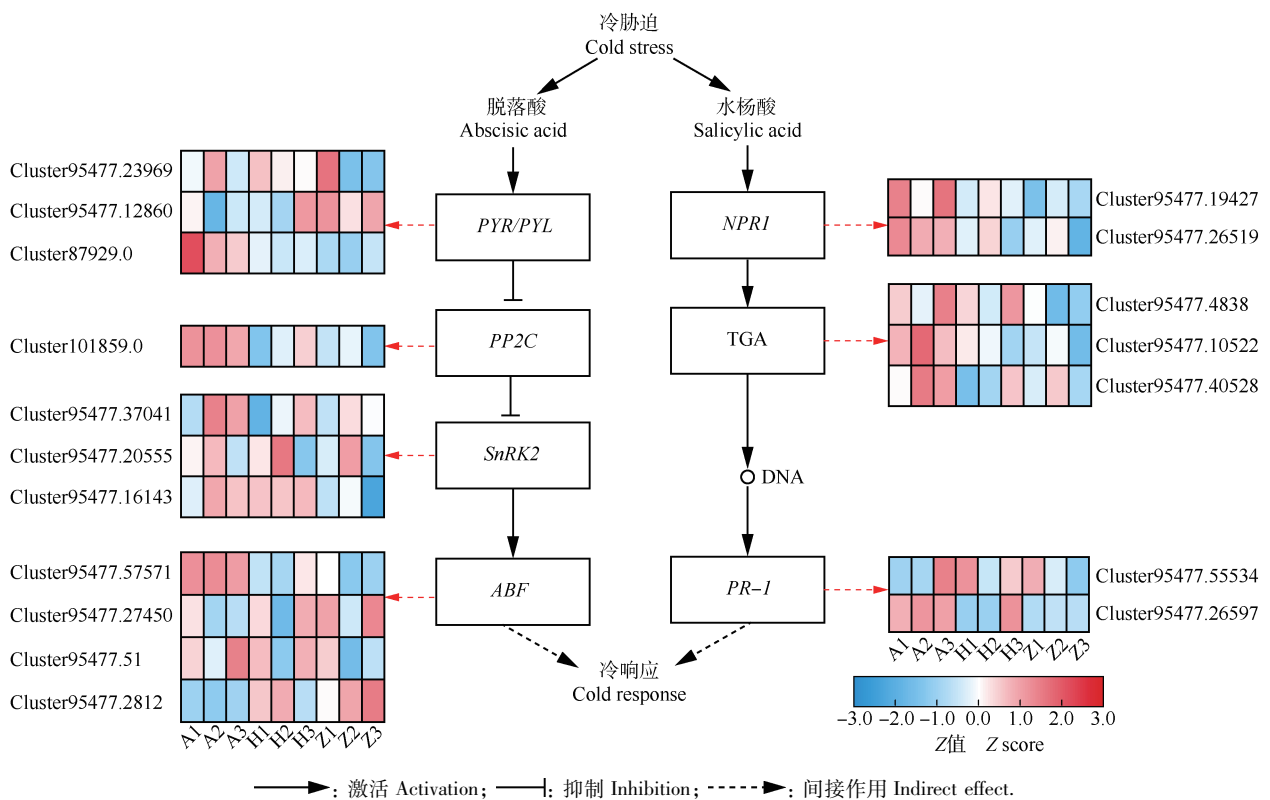


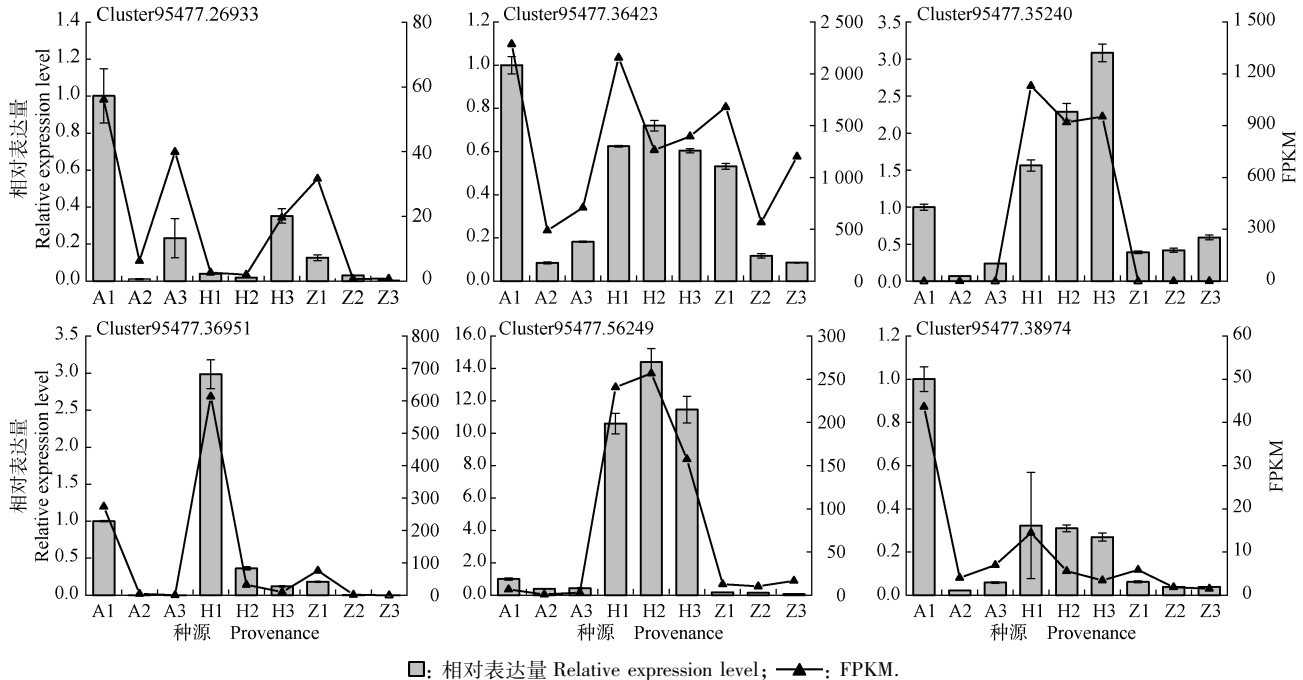
图 4 自然越冬过程 3 个种源天竺桂脱落酸和水杨酸信号通路中相关差异表达基因表达谱的变化
Fig. 4 Changes in expression profiles of associated differentially expressed genes in abscisic acid and salicylic acid signaling pathways of *Cinnamomum japonicum* Siebold from three provenances during natural overwintering process

因非表达子 1 (*NPR1*)、3 个 TGACG 结合模体 (TGA) 转录因子基因和 2 个病程相关基因 (*PR-1*)。

2.6 转录组测序差异表达基因 RT-qPCR 验证

为验证转录组测序结果的可靠性,随机选取了

6 个表达模式不同的差异表达基因进行 RT-qPCR 分析。结果(图 5)显示:6 个基因的 RT-qPCR 相对表达量变化趋势和转录组表达量变化趋势基本一致 ($R^2 \geq 0.7$),进一步证实所用转录组数据可靠。



FPKM: 每千碱基转录本每百万映射读取的片段数 Fragments per kilobase of transcript per million mapped reads. A1, A2, A3: T1、T2 和 T3 时间的安徽种源 Anhui provenance at T1, T2, and T3 times; H1, H2, H3: T1、T2 和 T3 时间的河南种源 Henan provenance at T1, T2, and T3 times; Z1, Z2, Z3: T1、T2 和 T3 时间的浙江种源 Zhejiang provenance at T1, T2, and T3 times. T1: 2024 年 11 月下旬 Late November 2024; T2: 2025 年 1 月下旬 Late January 2025; T3: 2025 年 2 月下旬 Late February 2025.

图 5 自然越冬过程 3 个种源天竺桂中部分差异表达基因的实时荧光定量 PCR 验证

Fig. 5 Real-time fluorescence quantitative PCR validation of some differentially expressed genes in *Cinnamomum japonicum* Siebold from three provenances during natural overwintering process

3 讨 论

3.1 自然越冬过程天竺桂的激素响应

冷胁迫通过破坏细胞膜稳定性、抑制光合作用等途径严重制约植物生长,因此,解析植物响应冷胁迫的生理与分子调控机制,对于抗寒育种具有重要价值。在长期进化过程中,植物形成了以激素为核心的冷适应策略,通常表现为吲哚乙酸和赤霉素含量下降以减缓生长耗能,同时脱落酸和水杨酸积累激活抗逆通路,实现能量重分配与胁迫防御的平衡^[28-29]。

河南种源不同时期天竺桂叶片中吲哚乙酸含量均显著高于 ($p < 0.05$) 安徽和浙江种源,并初步判定 3 个种源的抗寒性由强到弱依次为河南种源、安徽种

源、浙江种源。推测天竺桂通过吲哚乙酸介导的细胞伸长和分化能力维持组织活性,这与芍药耐寒种源的吲哚乙酸调控模式一致^[14]。这也说明维持吲哚乙酸稳态可能是植物越冬的关键预适应机制,且这一机制在不同植物中相似。脱落酸可以激活还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 氧化酶的产生以提高抗氧化酶的活性,进而清除活性氧 (ROS) 对植物的伤害^[30]。王楚侨等^[29]的研究结果显示:施加外源脱落酸可以增强火龙果 [*Selenicereus undatus* (Haw.) D. R. Hunt] 对 ROS 的清除能力,进而提高火龙果的抗寒性。总体上看,安徽和河南种源天竺桂叶片中脱落酸含量较高,并且在自然越冬过程显著上升,而浙江种源天竺桂叶片中脱落酸含量在自然越冬过程显著下降,这可能是冷胁迫损伤导致脱落酸的合成被抑

制。水杨酸作为信号分子参与植物抗逆信号传递,激活防卫反应并诱导系统获得抗性形成^[31]。天竺桂叶片中水杨酸和脱落酸含量在同一时间不同种源之间表现出相似性,在2025年1月下旬和2月下旬安徽种源天竺桂叶片的水杨酸和脱落酸含量均显著高于其他2个种源,表明安徽种源的天竺桂通过更强烈的水杨酸和脱落酸响应来应对冷胁迫。这种生理调节上的差异正是不同种源天竺桂表现出不同抗寒性的具体体现。赤霉素含量的降低可以有效抑制植物生长,进而增强植物对冷胁迫的抵抗能力^[32]。2025年1月下旬和2月下旬河南种源天竺桂叶片中赤霉素A1含量显著低于安徽种源,这可能源于河南种源的天竺桂在温带边缘分布区的进化适应,体现了其在生长调节与耐寒性平衡方面的重要适应策略。相比之下,在2024年11月下旬浙江种源天竺桂叶片中赤霉素A1含量显著高于其他2个种源,但在2025年1月下旬和2月下旬却显著低于其他2个种源,这种变化可能是由于浙江种源的天竺桂受到冷胁迫损伤,导致赤霉素A1的合成受到抑制。

3.2 自然越冬过程天竺桂的转录调控通路

通过高通量转录组测序研究冷胁迫过程植物基因的差异表达、代谢网络及生物学机制具有重要的意义。目前转录组技术在冷胁迫下杂种鹅掌楸(*Liriodendron × sinoamericanum*)^[30]、樟(*Camphora officinarum* Nees)^[33]、杜鹃属植物^[21]、乐东拟单性木兰^[22]、葡萄属(*Vitis* Linn.)植物^[34]等物种中均有报道。利用转录组测序技术能够获取冷胁迫下植物中大量抗寒基因序列信息。通过对自然越冬过程3个种源天竺桂进行叶片转录组测序研究,共获得192 466个unigene,通过Nr、Nt、KO、Swiss-Prot、KOG、GO和PFAM数据库注释,其中104 747个unigene获得注释,成功注释比例仅为54.4%。这可能是由于目前天竺桂的研究处于初步探索阶段,缺乏参考基因组,只能依赖无参转录组进行分析,从而导致unigene注释比例较低。类似的情况在越南安息香(*Styrax tonkinensis* (Pierre) Craib ex Hartwich)的研究中也存在^[35]。这也表明非模式木本植物存在大量未知调控元件,可能蕴含物种特异性抗寒基因资源,在后续的研究中可结合多组学技术进一步挖掘。

植物在长期进化过程中,为了抵御和适应冷胁迫,形成了复杂而高效的分子调控机制,通过诱导相关的基因来适应胁迫。以2025年1月下旬河南种源

天竺桂为对照,从天竺桂转录组数据中共获得19 399个差异表达基因,值得注意的是,2025年1月下旬安徽和浙江种源天竺桂的差异表达基因分别有13 099和8 728个,而2024年11月下旬和2025年2月下旬河南种源天竺桂的差异表达基因分别有2 089和699个,这也印证了地理隔离导致的基因组分化^[1],河南种源的天竺桂在长期低温选择压力下形成了独特的转录调控架构。对冷胁迫下多个植物的差异表达基因进行KEGG富集分析,发现主要的通路有植物激素信号转导以及淀粉和蔗糖代谢等,与本研究结果相似^[12,30,32,36]。差异表达基因在苯丙烷类生物合成通路的富集,表明河南种源通过增强细胞壁刚性抵御低温损伤,该策略与牡丹在低温应答中显著积累苯丙氨酸衍生代谢物的结果一致^[10]。可溶性糖是植物响应胁迫的重要物质,淀粉和蔗糖代谢通路决定了植物中可溶性糖的水平^[37]。天竺桂在自然越冬过程中通过糖类呼吸代谢产生更多的中间体和能量来支持植物生长,进而缓解伤害。*k-means*聚类分析以及WGCNA的棕色和青绿色模块基因的KEGG富集分析结果显示:以2025年1月下旬河南种源天竺桂为对照,2025年1月下旬安徽和浙江种源以及2024年11月下旬和2025年2月下旬河南种源天竺桂的差异表达基因均富集到植物激素信号转导通路,说明植物激素在天竺桂冷胁迫耐受中发挥着重要的调控作用。在甜根子草(*Saccharum spontaneum* Linn.)的冷胁迫研究中发现,植物激素信号转导以及淀粉和蔗糖代谢通路富集基因明显增多,这些特定基因参与并调节其生长发育,从而提高其对低温的耐受性^[38],与本研究结果一致。冷胁迫后杜鹃属植物 α -亚麻酸代谢通路出现显著富集,说明冷胁迫影响植物生长发育,但不同植物间存在差异^[21]。大量研究结果证实,脱落酸和水杨酸在植物响应逆境胁迫时发挥重要作用^[30,39-40]。自然越冬过程3个种源天竺桂叶片中脱落酸和水杨酸含量均出现了显著变化,这也说明脱落酸和水杨酸信号通路在天竺桂响应冷胁迫中起着关键的作用。天竺桂受冷胁迫后不仅激活了脱落酸和水杨酸信号通路,也影响了*PYR/PYL*、*SnRK2*、*ABF*和*NPR1*等关键基因的表达,进一步揭示了这些关键基因在天竺桂自然越冬过程中具有重要的调节作用。在后续的研究中应使用相应分子手段,进一步对这些基因展开研究,以揭示更多关于天竺桂响应冷胁迫的分子机制。

4 结 论

综上所述,自然越冬过程 3 个种源天竺桂叶片中吲哚乙酸、脱落酸、水杨酸和赤霉素 A1 含量出现不同程度的变化,不同种源天竺桂的激素调控策略存在显著差异,其中河南种源通过主动调节生长和防御激素,展现了最优的抗寒策略。植物激素信号转导以及淀粉和蔗糖代谢通路等是自然越冬过程天竺桂的重要代谢途径,这些途径中特定基因表达量的变化有利于天竺桂缓解冷胁迫带来的伤害。其中 *PYR/PYL*、*SnRK2*、*ABF* 和 *NPR1* 等基因可能在天竺桂响应冷胁迫中发挥着重要作用。后续将对天竺桂基因功能的鉴定和互作及耐寒品种的选育进行进一步研究。

参考文献:

- [1] 杨颖,刘向东,段豪,等.基于 SLAF-seq 的天竺桂群体遗传变异分析[J].南京林业大学学报(自然科学版),2022,46(5):33-39.
- [2] 张品英.天竺桂园林绿化苗木培育技术[J].中国园艺文摘,2012,28(3):121-122,132.
- [3] 罗世惠,黄婷,史宗畔,等.4种樟属植物精油抗氧化活性的比较研究[J].重庆师范大学学报(自然科学版),2018,35(1):111-116.
- [4] 赵春超.天竺桂精油、黄酮和原花青素的分离工艺研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2018:40.
- [5] 魏琴,谭韵雅,李群,等.五种樟属植物叶水浸提液的 GC-MS 分析[J].四川大学学报(自然科学版),2015,52(1):193-198.
- [6] LIN H Y, YANG Y, LI W H, et al. Species boundaries and conservation implications of *Cinnamomum japonicum*, an endangered plant in China[J]. Journal of Systematics and Evolution, 2024, 62(1):73-83.
- [7] 陈辉,周成玲,胡来宝,等.苏北地区 4 种常绿阔叶树种引种栽培适应性分析[J].西南林业大学学报(自然科学),2019,39(4):149-154.
- [8] 段豪,施钦,王紫阳,等.基于天竺桂转录组测序的 SSR 序列分析及 EST-SSR 标记开发[J].分子植物育种,2020,18(21):7095-7103.
- [9] WANG J, SU B Z, JIANG H Q, et al. Traditional uses, phytochemistry and pharmacological activities of the genus *Cinnamomum* (Lauraceae): a review[J]. Fitoterapia, 2020, 146:104675.
- [10] MAO Y X, JI X T, MENG Q Y, et al. Contribution of anthocyanin and polyunsaturated fatty acid biosynthesis to cold tolerance during bud sprouting in tree peony[J]. Industrial Crops and Products, 2022, 188:115563.
- [11] TIWARI M, KUMAR R, SUBRAMANIAN S, et al. Auxin-cytokinin interplay shapes root functionality under low-temperature stress[J]. Trends in Plant Science, 2023, 28(4):447-459.
- [12] LIU B, WANG X Y, CAO Y, et al. Factors affecting freezing tolerance: a comparative transcriptomics study between field and artificial cold acclimations in overwintering evergreens[J]. The Plant Journal, 2020, 103(6):2279-2300.
- [13] 张赞培,谷月营,尚旭岚,等.自然低温下 23 个青钱柳家系耐寒性评价[J].南京林业大学学报(自然科学版),2024,48(4):85-92.
- [14] 王琪瑶,李丹青,郭俊宏,等.哈尔滨越冬栽培的芍药根茎耐寒生理测定和关键基因筛选[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2025,51(1):148-163.
- [15] TAKAHASHI D, LI B, NAKAYAMA T, et al. Plant plasma membrane proteomics for improving cold tolerance[J]. Frontiers in Plant Science, 2013, 4:90.
- [16] GONG Z Z, XIONG L M, SHI H Z, et al. Plant abiotic stress response and nutrient use efficiency[J]. Science China. Life Sciences, 2020, 63(5):635-674.
- [17] 邱健,殷云龙,王芝权,等.‘中山含笑’与台湾含笑母树及其无明显表型变异子代的抗寒性分析[J].植物资源与环境学报,2023,32(1):29-38.
- [18] 陈慧杰,严子桢,齐香玉,等.不同绣球品种耐寒性评价及主要指标筛选[J].植物资源与环境学报,2024,33(2):41-49.
- [19] 李红喜.伏牛山北坡天竺桂引种试验及抗寒生理生化研究[D].长沙:中南林业科技大学,2014:52.
- [20] 王凤英,胡永红,田旗.低温胁迫对海岛植物普陀樟抗寒性生理指标的影响[J].云南植物研究,2010(增刊17):97-100.
- [21] LIU B, ZHAO F M, CAO Y, et al. Photoprotection contributes to freezing tolerance as revealed by RNA-seq profiling of *Rhododendron* leaves during cold acclimation and deacclimation over time[J]. Horticulture Research, 2022, 9:uhab025.
- [22] 李瑞雪,汪结明,李贯虹,等.低温胁迫下乐东拟单性木兰的转录组测序及生物信息学分析[J].复旦学报(自然科学版),2025,64(1):96-112.
- [23] WANG J, WEI M H, WANG H Y, et al. A time-course transcriptome reveals the response of watermelon to low-temperature stress[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2024, 24(5):1786-1799.
- [24] XU L, YANG L J, LI A P, et al. An AP2/ERF transcription factor confers chilling tolerance in rice[J]. Science Advances, 2024, 10(35):eado4788.
- [25] YANG A, DAI X Y, ZHANG W H. A R2R3-type MYB gene, *OsMYB2*, is involved in salt, cold, and dehydration tolerance in rice[J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(7):2541-2556.
- [26] FU D Y, SONG Y, WU S F, et al. Regulation of alternative splicing by CBF-mediated protein condensation in plant response to cold stress[J]. Nature Plants, 2025, 11(3):505-517.