网络出版时间:2026-01-09 DOI:10.13207/j.jnwafu.2026.07.011

豌豆耐高温种质筛选及其响应高温胁迫的转录组分析

李程勋[1],徐晓俞[1],林威鹏[2],林财[3],李爱萍[1]

(1 福建省农业科学院 作物研究所/福建省特色旱作物品种选育工程技术研究中心,福建 福州 350013;
2 仙游县农技推广中心,福建 莆田 351200;3 连江县本源农业专业合作社,福建 福州 350513)

[摘 要] 【目的】研究高温胁迫下豌豆的生理响应及转录组数据变化,为耐高温豌豆品种选育提供依据。【方法】选取29份豌豆种质资源,测定高温胁迫下豌豆的相对叶绿素含量(SPAD值)及抗氧化酶(超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT))活性和丙二醛(MDA)、脯氨酸(PRO)、蛋白含量等生理指标;同时,对主栽品种中豌6号进行高温胁迫转录组分析,并用RT-qPCR验证差异表达基因。【结果】高温胁迫显著影响了豌豆的相对叶绿素含量(SPAD值)、SOD活性、脯氨酸(PRO)和蛋白含量。运用主成分分析、隶属函数标准化和聚类分析,将29份豌豆种质资源分为耐高温型、中间型和敏感型3个等级,其中云豌59号、滇豌1号、中豌6号和嫩苔8号被划分为耐高温型资源。转录组分析发现,高温胁迫下豌豆叶片中大量基因表达发生显著变化,且随胁迫时间延长,差异表达基因数量显著增加。KEGG功能富集分析显示,MAPK信号通路、核糖体通路和乙醛酸盐代谢通路在豌豆高温响应中发挥重要作用。GO功能富集分析筛选出高温响应核心基因:Ⅰ类热休克蛋白基因(*novel* 200)、核酮糖二磷酸羧化酶基因(*KIW*84_036234)和糖基水解酶基因(*KIW*84_040407)。【结论】在高温胁迫下,豌豆通过生理和分子机制调节表现出耐高温特性,筛选出的耐高温品种和关键基因可用于豌豆耐高温品种选育。

[关键词] 豌豆;高温胁迫;耐高温种质;生理指标;转录组分析

[中图分类号] Q945.78;S529 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2026)07-0096-13

Identification of heat-tolerant pea germplasm and transcriptome analysis under heat stress

LI Chengxun[1],XU Xiaoyu[1],LIN Weipeng[2],LIN Cai[3],LI Aiping[1]

(1 *Crop Research Institute,Fujian Academy of Agricultural Sciences/Fujian Engineering Research Center for Characteristic Dry Crop Varieties Breeding,Fuzhou,Fujian* 350013,*China*;2 *Xianyou County Agricultural Technology Promotion Center,Putian,Fujian* 351200,*China*;3 *Lianjiang Benyuan Agricultural Cooperative,Fuzhou,Fujian* 350513,*China*)

Abstract:【Objective】This study aims to investigate the physiological responses and transcriptomic changes of peas under heat stress,providing a basis for breeding heat-tolerant pea varieties.【Method】A total of 29 pea germplasm resources were selected to measure physiological indicators under high-temperature stress,including relative chlorophyll content (SPAD value),antioxidant enzyme (SOD,POD,CAT) activities,malondialdehyde (MDA) content,proline (PRO) content,and protein content. Transcriptome sequencing was conducted on the main cultivated variety 'Zhongwan 6' under high-temperature stress to identify differentially ex-

[收稿日期] 2025-06-04 [修回日期] 2025-07-30

[基金项目] 福建省公益类科研院所专项(2024R10300010);福建省农业科学院科技创新团队项目(CXTD2021011-2);福建省人民政府、中国农业科学院"5511"协同创新工程项目(XTCXGC2021019);福建省农业科学院对外合作项目(DWHZ-2024-18)

[作者简介] 李程勋(1991—),男,福建南安人,助理研究员,硕士,主要从事作物遗传品质育种与农产品天然产物提取研究。E-mail:1219513539@qq.com

[通信作者] 李爱萍(1968—),女,福建莆田人,研究员,主要从事作物遗传品质育种及农产品天然产物提取研究。E-mail:apl909@163.com

pressed genes（DEGs）. The expression patterns of key genes were further validated using RT-qPCR.【Result】High-temperature stress significantly impacted chlorophyll content, superoxide dismutase（SOD）activity, proline content, and protein content in peas. Through principal component analysis, membership function standardization, and cluster analysis, the 29 pea germplasm resources were categorized into three groups: heat-tolerant, intermediate, and sensitive. 'Yunwan 59', 'Dianwan 1', 'Zhongwan 6', and 'Nentai 8' were identified as heat-tolerant varieties. Transcriptome analysis revealed that high temperature stress induced significant expression changes in a large number of genes in pea leaves, with the number of DEGs increasing significantly over time. KEGG functional enrichment analysis highlighted that the MAPK signaling pathway, ribosome pathway, and glyoxylate and dicarboxylate metabolism pathway play crucial roles in the high temperature response of peas. GO functional enrichment analysis identified the following core genes involved in high temperature response: class I heat shock protein gene *novel* 200, ribulose bisphosphate carboxylase gene *KIW*84_036234, and glycosyl hydrolase gene *KIW*84_040407.【Conclusion】Peas exhibit heat tolerance through physiological and molecular mechanisms under heat stress. The identified heat-tolerant varieties and key genes can be used for the breeding of heat-tolerant pea varieties.

Key words: pea; high temperature stress; high-temperature-tolerant germplasm; physiological indicators; transcriptome analysis

高温胁迫是农业生产中常见的环境逆境之一，对农作物的生长发育和产量形成造成严重影响[1]。豌豆作为一种重要的粮食和蔬菜作物，其生长周期较长，对温度变化较为敏感，尤其在高温环境下，豌豆的光合作用、抗氧化系统和细胞膜稳定性等生理过程易受到干扰，进而影响其产量和品质[2]。在豌豆生长周期中，超过 26 ℃时平均气温每升高 1 ℃产量可能减少 0.6～0.8 t/hm^2[3-4]。因此，深入研究豌豆的耐高温特性，对于提高高温环境下豌豆的适应能力及保障豌豆生产具有重要意义。

植物种质资源耐热鉴定包括多种研究层次，有表型耐热鉴定、生理学特征耐热鉴定、生化特性耐热鉴定和细胞学耐热鉴定等[5-7]。近年来，随着分子生物学技术的不断发展，越来越多的研究开始关注植物耐高温的分子机制。研究表明，在高温胁迫下植物会启动一系列复杂的生理和分子响应机制，包括抗氧化酶系统的激活、热休克蛋白（HSPs）的表达、激素信号通路的调节以及基因表达的改变等[8-10]。LIAO 等[11]通过水稻耐热和热敏品系的转录组分析，成功鉴定品系之间 35 个转录本的差异表达，并有 21 个转录本在功能上得到验证。GONZÁLEZ-SCHAIN 等[12]对比了在热胁迫下耐热水稻和热敏感水稻的表现，鉴定出 18 个热胁迫应答基因。ZHAO 等[13]对马铃薯全基因组中的 *HSP*20 家族基因进行热胁迫响应研究，进一步利用荧光定量 PCR 鉴定出 14 个 *HSP*20 基因在热胁迫中上调表达。FREY 等[14]对热胁迫处理下玉米幼苗的 RNA-seq 分析表明，与蛋白质合成、光合作用和各种代谢物合成相关的基因存在差异表达。王栋[15]利用 XP-GWAS 和选择性消除分析等方法，在豌豆中首次发现 *Psat*06*G*00205000、*Psat*04*G*0461400 和 *Psat*01*G*025200 等 3 个新的耐热候选基因。目前，虽然已有研究通过高通量测序技术鉴定了一些响应高温胁迫的基因和蛋白[15]，但与水稻等作物相比，豌豆耐高温特性的研究相对较少，尤其是在分子水平上的研究还不够深入。此外，豌豆资源繁多，不同资源的耐高温能力存在显著差异，因此系统地评估豌豆品种的耐高温特性，并揭示其耐高温的分子机制，对于豌豆的耐高温育种具有重要的指导意义。本研究以 29 份豌豆种质资源为材料，通过生理指标测定和转录组测序分析相结合的方法，系统研究了在高温胁迫下豌豆的生理响应和基因表达变化，旨在建立豌豆耐高温综合评价体系，筛选出耐高温豌豆资源，初步探索豌豆耐高温的分子机制，鉴定关键差异表达基因，为豌豆耐高温品种的选育以及高温胁迫下豌豆的栽培管理提供理论依据和技术支持。

1　材料与方法

1.1　植物材料

本研究选取的 29 份豌豆种质资源，主要包括各生态区主栽品种和微核心种质资源，涵盖不同地理来源和遗传背景（表 1）。

表1 供试豌豆资源信息

Table 1 Information of pea germplasm resources used in this study

编号No.	名称Name	来源Source	编号No.	名称Name	来源Source
W01	桂豌2号 Guiwan 2	广西 Guangxi	W16	闽豌1号 Minwan 1	福建 Fujian
W02	超级王 Super King	宁波大学 Ningbo University	W17	台湾软荚604 Taiwan soft-podded pea 604	台湾 Taiwan
W03	奇珍76 Qizhen 76	广东省良种引进服务公司 Guangliang Company	W18	甘翠豌豆 Gancui pea	甘肃 Gansu
W04	苏豌9号 Suwan 9	江苏 Jiangsu	W19	紫荚豌豆 Purple pod pea	英国 United Kingdom
W05	中秦一号 Zhongqin 1	河北 Hebei	W20	台湾长寿仁 Taiwan longevity kernel	台湾 Taiwan
W06	云豌18号 Yunwan 18	云南 Yunnan	W21	甘翠2号 Gancui 2	甘肃 Gansu
W07	云豌59号 Yunwan 59	云南 Yunnan	W22	中豌6号 Zhongwan 6	北京 Beijing
W08	滇豌1号 Dianwan 1	云南 Yunnan	W23	中豌11号 Zhongwan 11	北京 Beijing
W09	嫩苔8号 Nentai 8	甘肃 Gansu	W24	碧玉豌豆 Biyu pea	甘肃 Gansu
W10	食荚大菜豌1号 Edible-podded Dacaiwan 1	四川 Sichuan	W25	众扬8号 Zhongyang 8	甘肃 Gansu
W11	大菜豌 Dacaiwan	四川 Sichuan	W26	鲜嫩二号 Xiannen 2	甘肃 Gansu
W12	珍宝99 Zhenbao 99	甘肃 Gansu	W27	高柳1号 Gaoliu 1	甘肃 Gansu
W13	B582-170	美国 United States	W28	陇府1号 Longfu 1	甘肃 Gansu
W14	闽甜豌1号 Mintianwan 1	福建 Fujian	W29	姚精选豌豆 Yao's selective pea	乌盟 Ulanqab
W15	闽甜豌2号 Mintianwan 2	福建 Fujian			

1.2 处理方法

挑选颗粒饱满的豌豆种子进行浸种催芽后,播种于育苗盘,置于人工气候培养箱,于20 ℃培养至两叶一心期,将试验组转移到37 ℃培养箱中培养(结合文献[16]与前期试验,37 ℃高温处理能够有效模拟在高温胁迫下豌豆的生理响应,不同豌豆资源在37 ℃培养48 h时具有较明显的表型差异),对照组一直在20 ℃培养箱,处理48 h后取试验组和对照组植株叶片进行检测,每个处理3次重复。

1.3 测定指标及方法

测定指标包括相对叶绿素含量(SPAD值)、抗氧化酶(超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT))活性及丙二醛(MDA)、脯氨酸(PRO)和蛋白含量。测定方法如下。

相对叶绿素含量(SPAD值):采用叶绿素仪(SPAD-502 Plus)测定。

抗氧化酶活性:SOD活性采用WST-8法测定(试剂盒:苏州格瑞思生物科技有限公司,货号G0101W),POD活性采用愈创木酚比色法测定(试剂盒:苏州格瑞思生物科技有限公司,货号G0107W),CAT活性采用新型探针显色法测试(试剂盒:苏州格瑞思生物科技有限公司,货号G0105W)。

丙二醛(MDA)含量:采用硫代巴比妥酸法测定(试剂盒:苏州格瑞思生物科技有限公司,货号G0109W)。

脯氨酸(PRO)含量:采用酸性茚三酮法测定(试剂盒:苏州格瑞思生物科技有限公司,货号G0111W)。

蛋白含量:采用考马斯亮蓝法测定(试剂盒:苏州格瑞思生物科技有限公司,货号G0417W)。

1.4 豌豆耐高温综合评价

采用SPSS 19.0软件进行主成分分析、隶属函数标准化和聚类分析。性状指标显著性分析采用t检验方法。计算各指标的耐高温系数,并基于综合评价值(C值)对豌豆品种划分耐高温等级[17-18]。相关分析步骤如下。

(1)各指标耐高温系数计算:耐高温系数=试验组性状值/对照组性状值。

(2)主成分分析中根据特征值大于1提取主成分。

(3)利用隶属函数,将各指标在主成分分析中的得分值进行标准化:$F(X_i)=(X_i-X_{\min})/(X_{\max}-X_{\min})$,$i=1,2,3,\cdots\cdots,n$,其中$X_{\min}$、$X_{\max}$分别表示各性状在主成分分析中得分值的最小值和最大值。

(4)提取的第i个主成分的权重(W_i):$W_i=p_i\Big/\sum_{i=1}^{n}p_i$,其中$p_i$表示提取的主成分所对应的特征值。

(5)高温处理响应因子综合值(C):$C=$

$\sum_{i=0}^{n}\left[F(X_i)\times W_i\right]$。

1.5　转录组测序

对豌豆主栽品种中豌6号进行37 ℃高温胁迫处理2和48 h,取试验组和对照组豌豆叶片进行转录组测序,分析其在高温胁迫下的基因表达差异。采用Illumina测序平台进行测序,每个处理设置3个生物学重复。测序数据经过质量控制、比对和差异表达分析,筛选出显著差异表达基因(DEGs),并进行功能注释和通路富集分析。上述测序相关工作由武汉迈维代谢生物科技股份有限公司完成。

转录组数据通过DESeq2软件包进行差异表达分析[19],筛选出显著差异表达基因(DEGs),DEGs的筛选条件为$|\log_2 FC|\geqslant 1$,且FDR<0.05,并进行功能注释和通路富集分析[20-21]。

1.6　豌豆高温胁迫相关差异表达基因的RT-qPCR验证

利用RNA提取试剂盒分别提取对照组和试验组叶片的RNA,按照反转录试剂盒说明书将RNA反转录成cDNA,根据转录组数据中差异基因的序列信息,设计荧光定量PCR的特异性引物(表2),进一步按照荧光定量PCR试剂盒说明书中的反应体系和反应程序进行PCR扩增,以*Actin*为内参基因,采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算每个基因在不同样品中的相对表达量。

表2　荧光定量PCR的引物信息

Table 2　Primer information of fluorescence quantitative PCR

引物名称 Primer name	正向引物序列(5′→3′) Forward primer sequence (5′→3′)	反向引物序列(3′→5′) Reverse primer sequence (3′→5′)
Actin	CACAATTGGCGCTGAAAGAT	TAATTGAGTTAAATGTCGTCTCATGGAT
novel 200	TGTCCTATCCTAAGCACCCCA	CCACATTATTGCTCCTTTCGCC
KIW84_036234	TGAGGAAGGGATGGGTTCCA	ACGAACGAAAGCTTGAGGGT
KIW84_040407	CCACAATCATCCCTTCAACATTCA	TCGAGTATGTTGGCACGACC

2　结果与分析

2.1　高温胁迫对豌豆生理指标的影响

由表3可以看出,高温胁迫显著影响了豌豆的多项生理指标。与对照组相比,试验组豌豆相对叶绿素含量(SPAD值)下降了13.22%,表明高温胁迫抑制了豌豆叶片的光合作用效率。与对照相比,高温胁迫下豌豆SOD和POD活性分别上升了60.73%和11.56%,而CAT活性下降了11.79%,这表明高温胁迫诱导了豌豆体内的氧化胁迫,但不同抗氧化酶的响应存在差异。在高温胁迫下MDA、PRO和蛋白含量较对照分别上升了19.80%,118.28%和25.41%,上述结果表明高温胁迫导致细胞膜损伤加剧,同时豌豆通过积累脯氨酸和蛋白来增强自身的抗氧化能力。显著性分析结果表明,豌豆SPAD值、SOD活性以及PRO和蛋白含量对高温胁迫的响应具有显著性。

表3　高温胁迫对豌豆生理指标的影响

Table 3　Effects of high temperature stress on physiological indicators of pea germplasm resources

指标 Index	对照 Control	高温胁迫 HT stress	变化率/% Change rate	*t*值 *t* value
相对叶绿素含量(SPAD) Realtive chlorophyll content	37.11±8.03	32.20±6.08	−13.22	6.88*
SOD活性/(U·g^{-1}) SOD activity	560.38±381.84	900.73±644.02	60.73	5.99*
POD活性/(U·g^{-1}) POD activity	5 421.06±1 956.34	6 047.67±3 580.02	11.56	0.68
CAT活性/(μmol·min^{-1}·g^{-1}) CAT activity	932.17±250.67	822.22±296.37	−11.79	2.33
MDA含量/(nmol·g^{-1}) MDA content	17.46±6.27	20.91±11.81	19.80	1.94
PRO含量/(μg·g^{-1}) PRO content	2 124.50±1 763.76	4 637.38±3 724.01	118.28	10.79**
蛋白含量/(mg·g^{-1}) Protein content	50.09±13.06	62.82±28.43	25.41	4.80*

注:*表示0.05显著水平;**表示0.01显著水平。

Note: * indicates significance at the 0.05 level; ** indicates significance at the 0.01 level.

由表4可以看出,不同指标的耐高温系数差异较大,其中SPAD耐高温系数的变异系数较小,为19.38%,其他各单项指标耐高温系数的变异系数较大,变异幅度为47.00%~89.57%,表现出较为宽泛的浮动范围。因此以单个指标的耐热系数作为衡量豌豆资源响应高温胁迫的等级标准过于单一化,且并不准确,需要将各指标的耐高温系数进行整合,利用多元分析方法才能准确地评价豌豆资

源的耐高温特性。

表4 豌豆各单项指标的耐高温系数

Table 4 Heat tolerance coefficients for individual indexes of pea germplasm resources

指标 Index	极大值 Max	极小值 Min	平均值±标准差 Mean±*SD*	变异系数/% *CV*
相对叶绿素含量(SPAD) Relative chlorophyll content	1.22	0.43	0.89±0.17	19.38
SOD活性 SOD activity	6.85	0.34	2.28±2.04	89.57
POD活性 POD activity	2.69	0.36	1.16±0.65	55.88
CAT活性 CAT activity	3.37	0.04	1.01±0.61	60.95
MDA含量 MDA content	3.20	0.46	1.28±0.77	59.91
PRO含量 PRO content	8.64	0.57	2.68±2.28	85.13
蛋白含量 Protein content	3.19	0.48	1.31±0.62	47.00

2.2 豌豆耐高温综合评价方法的建立

基于上述显著性指标和耐高温系数分析结果,对高温胁迫后表现出显著差异变化的SPAD值、SOD活性、PRO含量和蛋白含量4个指标的耐高温系数进行主成分分析。基于主成分分析,按照特征值大于1的准则提取主成分,共提取了2个主成分因子,其累计方差贡献率达到77.30%(表5)。第1主成分主要反映了SOD活性、PRO含量和蛋白含量的信息,第2主成分主要反映了SPAD值的信息。提取的这2个主成分能综合反映出4个显著变异指标的基本信息。因此将这4个指标转化为2个新的综合性指标进一步对豌豆耐高温性进行评价。

基于上述转化的2个综合性评价指标,结合隶属函数分析,计算出各豌豆资源的耐高温胁迫综合评价值(*C*值);根据*C*值的大小划分不同豌豆资源对高温胁迫的抵抗能力,*C*值越大表明豌豆资源抗高温能力越强,*C*值越小表明豌豆资源抗高温能力越弱(表6)。

表5 高温胁迫后显著性变化性状的主成分分析

Table 5 Principal component analysis for traits with significant changes under high temperature stress

指标 Index	特征向量 Eigenvalue		成分矩阵 Component matrix	
	1	2	1	2
相对叶绿素含量(SPAD) Relative chlorophyll content	0.11	0.93	0.23	0.96
SOD活性 SOD activity	0.41	−0.31	0.85	−0.32
PRO含量 PRO content	0.40	0.02	0.83	0.02
蛋白含量 Protein content	0.38	0.05	0.78	0.05
特征值 Eigenvectors	2.06	1.03		
方差贡献率/% Variance contribution rate	51.61	25.68		
累计方差贡献率/% Cumulative variance contribution rate	51.61	77.30		

表6 豌豆耐高温综合评价值

Table 6 Comprehensive evaluation value for high temperature stress in pea germplasm resources

编号 No.	名称 Name	*C*值 *C* value	编号 No.	名称 Name	*C*值 *C* value
W01	桂豌2号 Guiwan 2	0.46	W16	闽豌1号 Minwan 1	0.45
W02	超级王 Super King	0.35	W17	台湾软荚604 Taiwan soft-podded pea 604	0.36
W03	奇珍76 Qizhen 76	0.27	W18	甘翠豌豆 Gancui pea	0.69
W04	苏豌9号 Suwan 9	0.19	W19	紫荚豌豆 Purple pod pea	0.30
W05	中秦一号 Zhongqin 1	0.52	W20	台湾长寿仁 Taiwan longevity kernel	0.25
W06	云豌18号 Yunwan 18	0.50	W21	甘翠2号 Gancui 2	0.29
W07	云豌59号 Yunwan 59	0.87	W22	中豌6号 Zhongwan 6	0.80
W08	滇豌1号 Dianwan 1	0.86	W23	中豌11号 Zhongwan 11	0.36
W09	嫩苔8号 Nentai 8	0.78	W24	碧玉豌豆 Biyu pea	0.21
W10	食荚大菜豌1号 Edible-odded Dacaiwan 1	0.23	W25	众扬8号 Zhongyang 8	0.29
W11	大菜豌 Dacaiwan	0.27	W26	鲜嫩二号 Xiannen 2	0.41
W12	珍宝99 Zhenbao 99	0.17	W27	高柳1号 Gaoliu 1	0.58
W13	B582-170	0.24	W28	陇府1号 Longfu 1	0.64
W14	闽甜豌1号 Mintianwan 1	0.36	W29	姚精选豌豆 Yao's selective pea	0.58
W15	闽甜豌2号 Mintianwan 2	0.36			

基于*C*值,利用欧氏距离组间平均连接法对不同豌豆品种响应高温胁迫能力进行聚类分析[22],结果见图1。

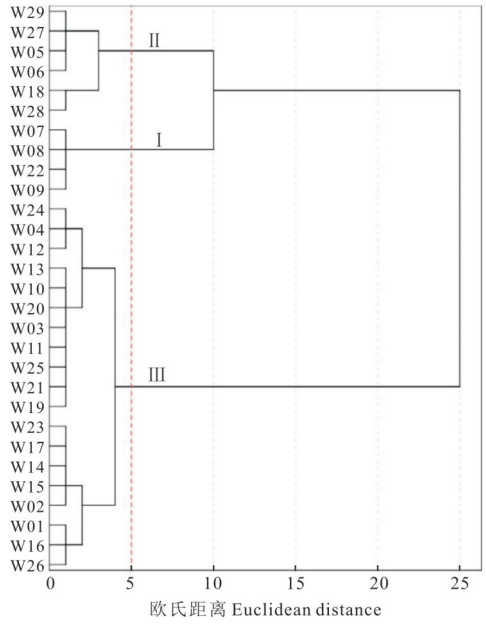


图 1　豌豆资源耐高温性综合聚类分析结果

Fig. 1　Result of cluster analysis of high temperature tolerance in pea germplasm resources

由图 1 可以看出，在欧氏距离为 5 时，可以将 29 份豌豆资源划分为 3 个等级：Ⅰ级耐高温型（$C \geqslant 0.7$）、Ⅱ级耐高温中间型（$0.5 \leqslant C < 0.7$）、Ⅲ级高温敏感型（$C < 0.5$），其中云豌 59 号、滇豌 1 号、中豌 6 号和嫩苔 8 号被划分为耐高温型资源。

2.3　豌豆耐高温的分子机制

2.3.1　*转录组测序数据质量评估与控制*　对未胁迫及胁迫 2 和 48 h 的豌豆叶片取样进行转录组测序分析，结果（表 7）表明，原始数据经过过滤、测序错误率检查和 GC 含量分布检查后获得 clean reads，总数据量 78.65 Gb，平均各处理获得的数据量 8.74 Gb，Q30 值（1‰ 碱基错误率）为 96.08%～96.57%，GC 含量为 45.27%～46.76%，说明数据质量较好，质控合格，可用于下一步组装。利用 HISAT2[23] 将 clean reads 与豌豆参考基因组进行序列比对，获取在参考基因组或基因上的位置信息，以及测序样品特有的序列特征信息。测序 reads 成功比对到基因组的比例为 97.33%～98.35%，说明转录组组装的数据质量较好，可用于后续分析。

2.3.2　*差异表达基因筛选*　对豌豆样本的转录组数据进行主成分分析，结果见图 2。

表 7　转录组测序质量与数据统计

Table 7　Quality and data statistics of transcriptome sequencing

样品 Sample	高质量 reads 数 Clean reads	数据量/Gb Clean bases	Q30/%	GC 含量/% GC content	比对到参考基因组的 reads 数 Reads mapped to reference genome	
					数据 Data	占比/% Proportion
ZW6-CK-1	6 214 0838	9.32	96.19	46.54	60 480 250	97.33
ZW6-CK-2	55 814 302	8.37	96.36	46.62	54 345 431	97.37
ZW6-CK-3	62 522 792	9.38	96.57	46.33	60 967 635	97.51
ZW6-Treat-2 h-1	44 461 166	6.67	96.14	46.11	43 587 449	98.03
ZW6-Treat-2 h-2	60 250 832	9.04	96.20	46.17	59 163 555	98.20
ZW6-Treat-2 h-3	65 517 324	9.83	96.46	45.27	64 433 252	98.35
ZW6-Treat-48 h-1	64 795 032	9.72	96.39	45.96	63 517 052	98.03
ZW6-Treat-48 h-2	54 031 308	8.10	96.18	46.09	53 099 015	98.27
ZW6-Treat-48 h-3	54 772 808	8.22	96.08	46.76	53 798 219	98.22

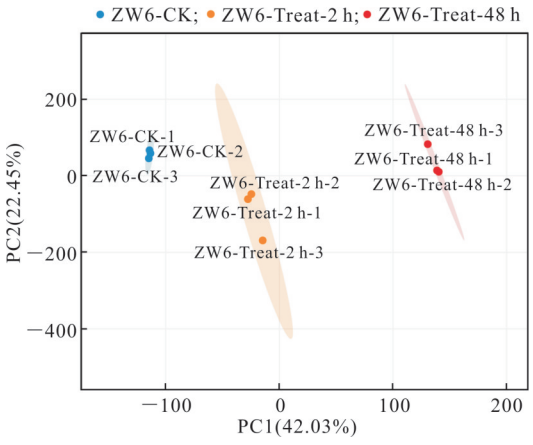


图 2　不同样本的 PCA 分析

Fig. 2　Principal component analysis based on FPKM values from three replicates of each samples

图 2 结果显示，主成分 1 和主成分 2 可以将豌豆高温处理组和对照组明显区分，其贡献值分别为 42.03% 和 22.45%。各处理 DEGs 的表达图谱如图 3 所示。图 3 表明，高温胁迫会使豌豆叶片中的基因表达量产生较大变化，ZW6-Treat-2 h 与 ZW6-CK 聚类的距离较 ZW6-Treat-48 h 与 ZW6-CK 的距离近，表明随着高温胁迫时间的延长，基因表达量的变化增大。差异基因数量变化结果（图 4）显示，ZW6-Treat-2 h VS ZW6-CK 组中共筛选出 DEGs 4 232 个，其中上调 1 626 个，下调 2 606 个；ZW6-Treat-48 h VS ZW6-CK 组中共筛选出 DEGs 7 376 个，其中上调 3 127 个，下调 4 249 个；ZW6-Treat-48 h VS ZW6-Treat-2 h 组中共筛选出 DEGs 5 402 个，其中上调

2 312个,下调3 090个,长时间(48 h)高温胁迫产生的DEGs数量是短时间(2 h)高温胁迫的1.74倍。DEGs的韦恩图结果(图5)显示,3对比较组合共有DEGs为845个,2对比较组合共有DEGs分别为810,1 899和2 822个。上述结果表明,高温胁迫影响豌豆叶片基因的表达量,且随着胁迫时间的延长,DEGs数量显著增加。

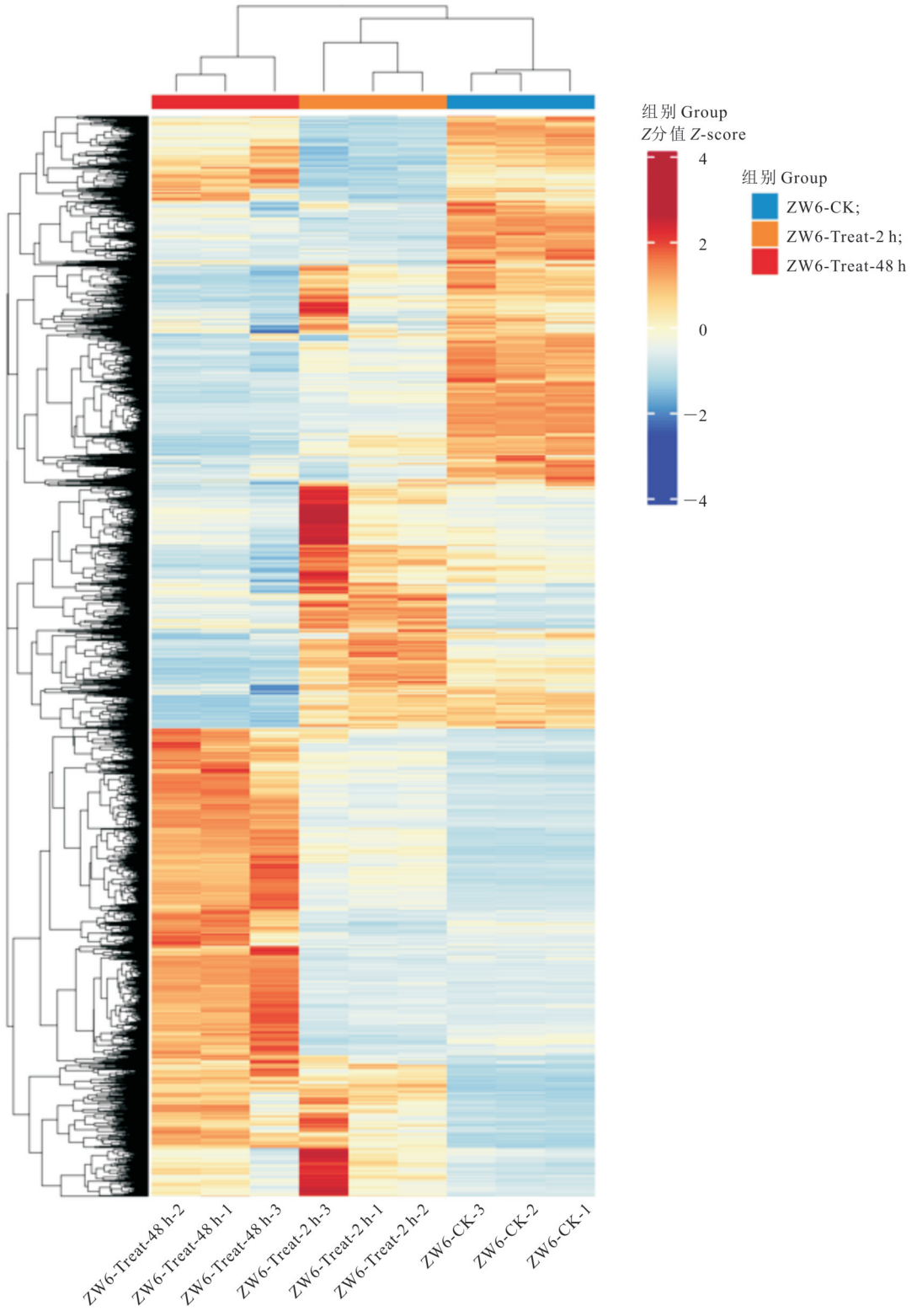


图3 不同处理差异基因表达谱热图

Fig. 3 Heatmap of DEGs expression profiles under different treatments

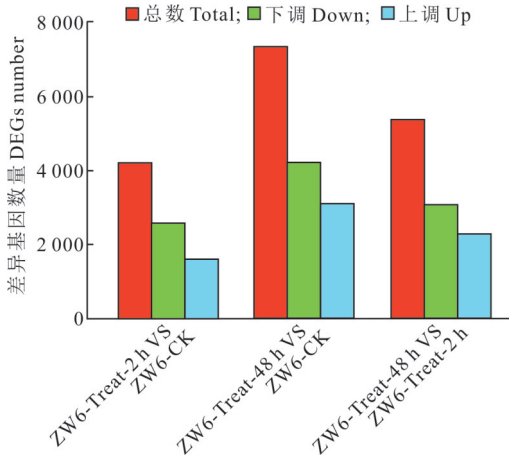


图 4　不同处理差异基因数量

Fig. 4　Number of DEGs under different treatments

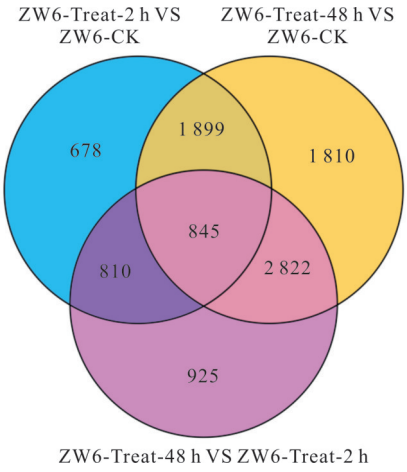


图 5　差异基因韦恩图

Fig. 5　Venn diagram of DEGs

2.3.3　差异表达基因的KEGG富集分析　对不同时间高温胁迫处理下豌豆ZW6-Treat-2 h VS ZW6-CK、ZW6-Treat-48 h VS ZW6-CK 和 ZW6-Treat-48 h VS ZW6-Treat-2 h 比较组合的 DEGs 进行 KEGG 富集分析，结果（图 6）表明，ZW6-Treat-2 h VS ZW6-CK 比较组合中，显著富集的通路主要有核糖体（ko03010）、硫代谢（ko00920）、类胡萝卜素生物合成（ko00906）、甜菜红素生物合成（ko00965）、次生代谢物的生物合成（ko00999）、MAPK 信号通路（ko04016）等 6 个，其中核糖体通路富集最显著，DEGs数量达到81个；ZW6-Treat-48 h VS ZW6-CK 比较组合中，显著富集的通路主要有 MAPK 信号通路（ko04016）和脂肪酸延长（ko00062），其中 MAPK 信号通路富集最显著，DEGs数量达到100个；ZW6-Treat-48 h VS ZW6-Treat-2 h 比较组合中，显著富集的通路主要有 MAPK 信号通路（ko04016）和乙醛酸盐和二羧酸盐代谢（ko00630），其中 MAPK 信号通路富集最显著，DEGs 数量达到 83 个。3 对比较组合中 DEGs 显著富集的均有 MAPK 信号通路，说明 MAPK 信号通路在豌豆响应高温胁迫中发挥了重要作用。

2.3.4　差异表达基因的GO富集分析　将ZW6-Treat-2 h VS ZW6-CK、ZW6-Treat-48 h VS ZW6-CK 和 ZW6-Treat-48 h VS ZW6-Treat-2 h 比较组合的 DEGs 按照 GO 数据库的生物过程、细胞组分和分子功能进行功能分类，列出各分类中前 15 个二级条目，结果见图 7。

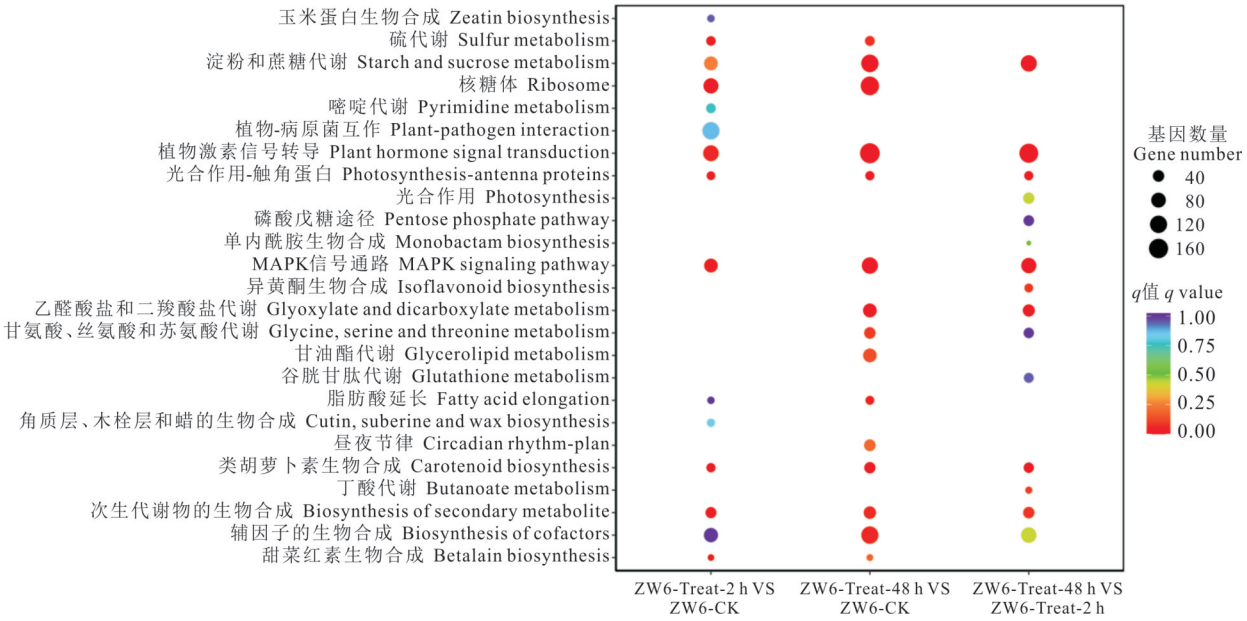
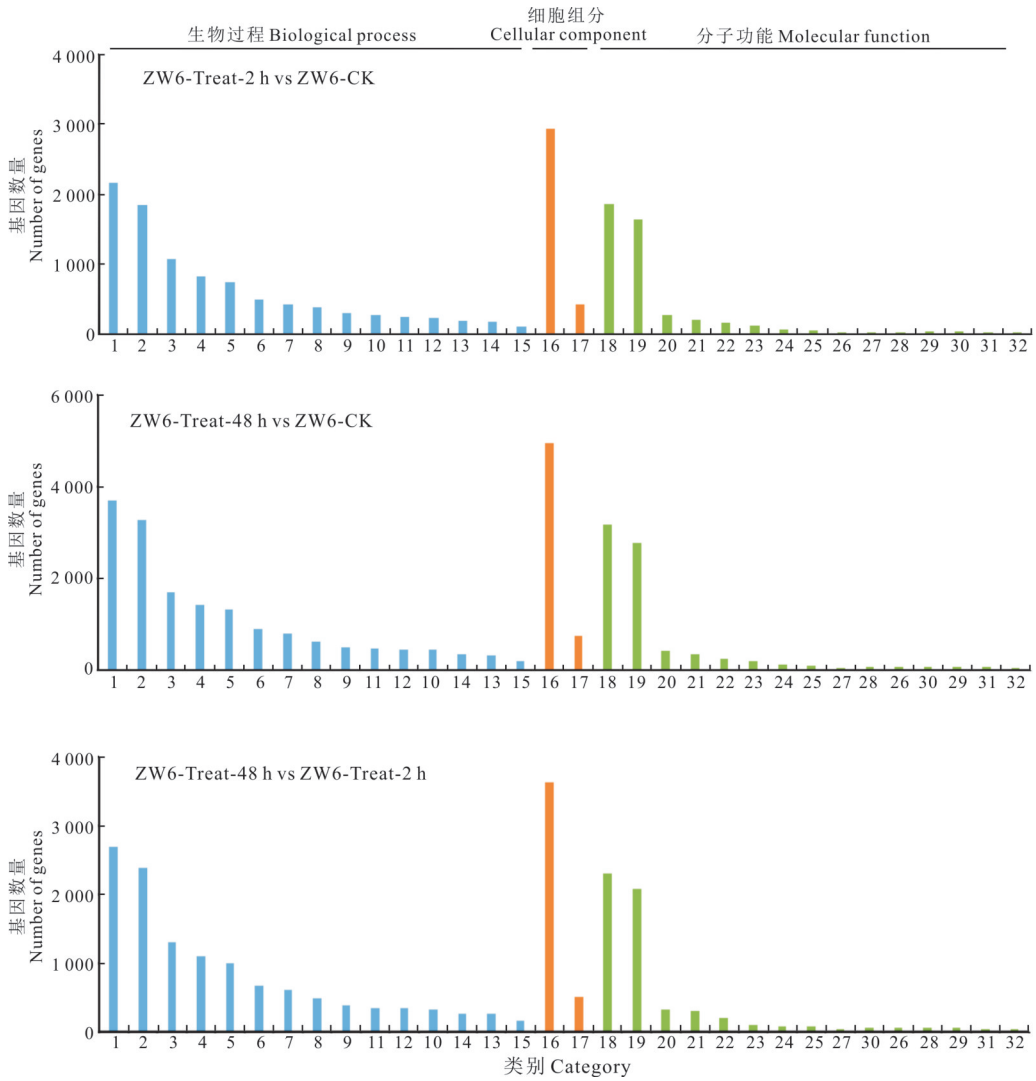


图 6　差异表达基因的KEGG富集图

Fig. 6　KEGG enrichment maps of DEGs



1. 细胞过程;2. 代谢过程;3. 刺激反应;4. 生物调节;5. 生物过程调节;6. 发育过程;7. 多细胞生物过程;8. 定位;9. 信号传导;10. 生物过程涉及生物之间的种间相互作用;11. 生殖;12. 生殖过程;13. 生物过程正调节;14. 生物过程负调节;15. 生长;16. 细胞解剖实体;17. 含蛋白复合物;18. 结合因子;19. 催化活性;20. 转运蛋白活性;21. 转录调节因子活性;22. ATP 依赖性活性;23. 结构分子活性;24. 分子功能调节活性;25. 分子转导活性;26. 蛋白质折叠伴侣;27. 抗氧化活性;28. 翻译调节活性;29. 分子接头活性;30. 细胞骨架运动活性;31. 小分子传感器活性;32. 分子载体活性。

1. Cellular process;2. Metabolic process;3. Response to stimulus;4. Biological regulation;5. Regulation of biological process;6. Developmental process;7. Multicellular organismal process;8. Localization;9. Signaling;10. Biological process involved in interspecies interaction between organisms reproduction;11. Reproduction;12. Reproductive process;13. Positive regulation of biological process;14. Negative regulation of biological process;15. Growth;16. Cellular anatomical entity;17. Protein-containing complex;18. Binding;19. Catalytic activity;20. Transporter activity;21. Transcription regulator activity;22. ATP-dependent activity;23. Structural molecule activity;24. Molecular function regulator activity;25. Molecular transducer activity;26. Protein folding chaperone;27. Antioxidant activity;28. Translation regulator activity;29. Molecular adaptor activity;30. Cytoskeletal motor activity;31. Small molecule sensor activity;32. Molecular carrier activity.

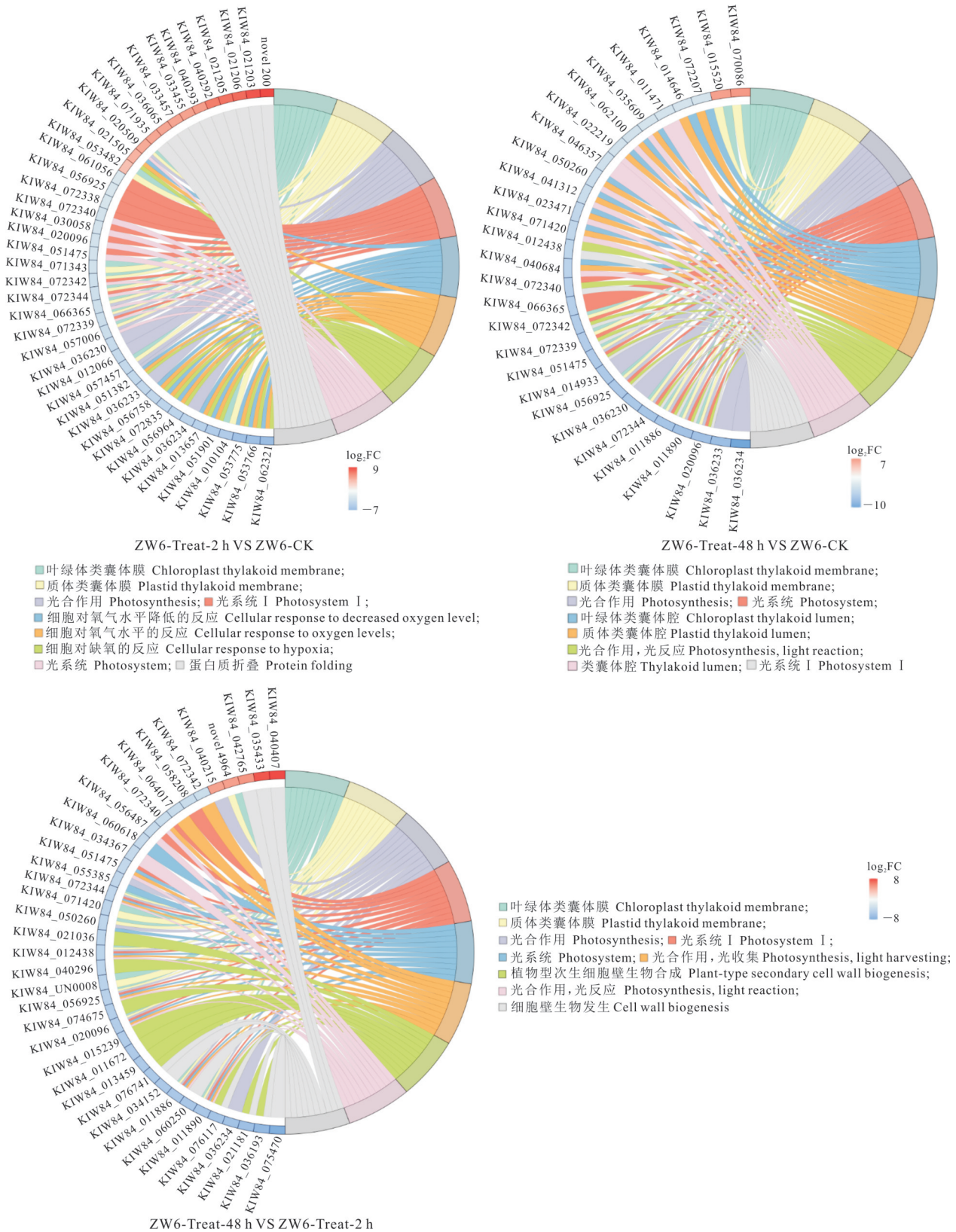
图 7 差异表达基因 GO 功能分类

Fig. 7 GO functional classification of DEGs

由图 7 可以看出,3 组处理的二级条目类别基本相同,生物过程分类中,3 组处理的 DEGs 主要参与细胞过程、代谢过程、刺激反应、生物调节和生物过程调节等;细胞组分分类中,3 组处理的 DEGs 主要参与细胞解剖实体和含蛋白复合物等;分子功能分类中,3 组处理的 DEGs 主要参与结合因子、催化活性、转运蛋白活性、转录调节因子活性和 ATP 依赖性活性等。3 组处理的主要区别在于,随着胁迫时间的延长,分子功能分类中的抗氧化活性、翻译调节活性和细胞骨架运动活性的基因数量排序更靠前,说明随着高温胁迫时间的延长,豌豆叶片中抗氧化活性、翻译调节活性和细胞骨架运动活性相关基因响应更加明显。

3 个比较组合中选择 q 值最小的 9 个 GO 条目及

每个条目中|log$_2$FC|最大的 10 个基因进行进一步分析，结果见图 8。



图形分为左右两侧：右侧为 q 值最小的 9 个 GO 条目；左侧为每个条目中|log$_2$FC|最大的 10 个基因，外侧热图表示对应基因的 log$_2$FC 值。

The chord diagram is divided into two sides: the right side displays nine GO terms with the smallest q-value, and the left side lists the 10 genes with the largest |log$_2$FC| for each term. The outer heat map represents the log$_2$FC value of the corresponding gene.

图 8　差异基因 GO 富集分析和弦图

Fig. 8　GO enrichment analysis of DEGs

由图8可以看出,3个比较组合中DEGs注释条目较为一致,共有的注释条目包括叶绿体类囊体膜(GO:0009535)、质体类囊体膜(GO:0055035)、光系统(GO:0009521)、光系统Ⅰ(GO:0009522)和光合作用(GO:0015979)。在3个比较组合的9个GO条目中,|$\log_2$FC|最大的10个DEGs以下调表达居多。ZW6-Treat-2 h VS ZW6-CK差异倍数最大的基因为*novel* 200($\log_2$FC=8.98),预测其为*HSP20*基因,属于Ⅰ类热休克蛋白基因,KEGG注释于内质网中的蛋白质加工通路;ZW6-Treat-48 h VS ZW6-CK差异倍数最大的基因为*KIW*84_036234($\log_2$FC=−10.50),预测其为核酮糖二磷酸羧化酶(RuBisCO)基因,KEGG注释于乙醛酸盐和二羧酸盐代谢通路;ZW6-Treat-48 h VS ZW6-Treat-2 h差异倍数最大的基因为*KIW*84_040407($\log_2$FC=8.28),预测其为糖基水解酶家族基因,KEGG注释于植物激素信号转导通路。以上结果表明,热休克蛋白基因、核酮糖二磷酸羧化酶基因和糖基水解酶基因的差异表达与豌豆高温胁迫密切相关。

2.3.5 豌豆高温胁迫相关差异表达基因的RT-qPCR验证 对筛选出的3个核心基因进行RT-qPCR验证,结果(图9)表明,ZW6-Treat-2 h VS ZW6-CK中*novel* 200上调12.47倍,ZW6-Treat-48 h VS ZW6-CK中*KIW*84_036234下调175.48倍,ZW6-Treat-48 h VS ZW6-Treat-2 h中*KIW*84_040407上调5.70倍。RT-qPCR分析结果与RNA-seq数据趋势一致,说明转录组数据可信度较高。

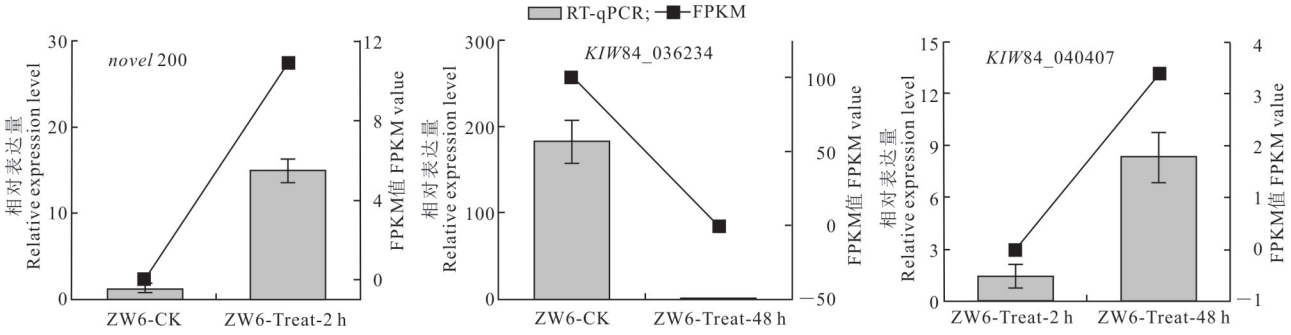


图9 3个调控基因的RT-qPCR和RNA-seq结果

Fig. 9 RT-qPCR and RNA-seq results of 3 regulatory genes

3 讨 论

3.1 豌豆耐高温的生理响应机制

高温胁迫对豌豆的生理指标产生了显著影响,相对叶绿素含量(SPAD值)的下降表明高温抑制了豌豆叶片的光合作用效率,这可能与高温导致的光合色素降解或光系统损伤有关[24]。与此同时,抗氧化酶活性的变化揭示了豌豆体内氧化胁迫的诱导,其中SOD活性显著上升,而CAT活性下降,表明豌豆在高温胁迫下通过激活部分抗氧化酶来应对活性氧的积累,但不同抗氧化酶的响应存在差异[25]。此外,MDA含量上升反映了细胞膜损伤的加剧,而脯氨酸(PRO)和蛋白含量的显著增加,则表明豌豆通过积累这些物质来增强自身的抗氧化能力和渗透调节能力[2]。这些生理指标的变化为豌豆耐高温特性的评估提供了重要的依据。

通过对耐高温系数的计算分析发现,单个生理指标的耐高温系数并不能准确反映豌豆的耐高温特性,因此本研究结合隶属函数分析、主成分分析和聚类分析方法,将多个生理指标综合起来对豌豆品种进行耐高温等级划分。结果表明,云豌59号、滇豌1号、中豌6号和嫩苔8号表现出较强的耐高温能力,而其他一些品种则对高温较为敏感。这种基于生理指标综合评价的方法为豌豆耐高温品种的筛选提供了一种有效途径[26]。

3.2 豌豆耐高温的分子机制

转录组测序分析揭示了豌豆在高温胁迫下的基因表达差异,为解析豌豆耐高温的分子机制提供了重要线索。本研究通过对高温胁迫2和48 h的豌豆叶片进行转录组测序,筛选出大量显著差异表达基因(DEGs),发现随着胁迫时间的延长,DEGs的数量显著增加,表明豌豆在长时间高温胁迫下启动了更为复杂的基因表达调控网络,这与前人在大豆芽中的研究结果[27]一致。

KEGG功能富集分析显示,MAPK信号通路在不同时间高温胁迫处理下均显著富集,且富集的DEGs数量较多,这表明MAPK信号通路在豌豆响应高温胁迫中发挥了重要作用。MAPK信号通路是一类经典的植物应激信号传导通路,其能够将外界环境信号传递到细胞内,激活一系列下游基因的

表达，从而调节植物的生长发育和逆境响应[28]。此外，核糖体通路、硫代谢通路、类胡萝卜素生物合成通路等也在高温胁迫下显著富集，这些通路的差异表达可能与豌豆在高温胁迫下的蛋白质合成[29]、代谢调节[30]和光合色素合成[31]等生理过程密切相关。

GO功能富集分析进一步揭示了高温胁迫下豌豆基因的功能分类特征。在生物学过程分类中，DEGs主要参与细胞过程、代谢过程和刺激反应等，这与高温胁迫对豌豆细胞结构和代谢活动的影响相一致；在细胞组分分类中，DEGs主要参与细胞解剖实体和含蛋白复合物，表明高温胁迫可能影响了豌豆细胞内的蛋白质复合体组装和细胞结构稳定性[32]；在分子功能分类中，随着胁迫时间的延长，抗氧化活性、翻译调节活性和细胞骨架运动活性相关基因的响应更加明显，这可能与豌豆在高温胁迫下维持细胞内氧化还原平衡、蛋白质合成调控和细胞形态稳定性有关[33]。

在热胁迫条件下，植物通过多种基因表达调节来增强自身的耐热性[34]。本研究通过对差异基因的进一步分析发现，热休克蛋白基因（*novel* 200）、核酮糖二磷酸羧化酶基因（*KIW*84_036234）和糖基水解酶基因（*KIW*84_040407）的差异表达与豌豆的高温胁迫响应密切相关。高温胁迫下豌豆热休克蛋白基因（*novel* 200）显著上调表达，植株内热休克蛋白含量增多。热休克蛋白作为分子伴侣，能帮助其他蛋白质正确折叠，维持细胞内蛋白质稳态，保护抗氧化酶的活性，从而增强豌豆的抗氧化能力[35]，这可能与高温胁迫下豌豆的SOD活性增加有关。在高温胁迫下豌豆核酮糖二磷酸羧化酶基因（*KIW*84_036234）显著下调表达，植株中RuBisCO含量下降。RuBisCO是光合作用的关键酶，其下调可能影响了光合色素的合成和光系统的稳定性，这可能是导致光合效率降低的直接原因。高温胁迫下糖基水解酶基因（*KIW*84_040407）显著上调表达，糖基水解酶相关基因的响应能够通过重塑细胞壁结构，增强细胞的完整性和稳定性[36]。生理指标的变化为豌豆耐高温特性的评估提供了重要依据，而转录组分析则揭示了豌豆在高温胁迫下的基因表达调控网络，将两者结合起来分析，可以更全面地理解豌豆耐高温的机制。

本研究仅对中豌6号进行了转录组分析，其结果可能无法完全代表所有豌豆品种的耐热分子机制。未来研究可以通过比较耐热和敏感品种的转录组差异，更精准地定位与耐热性直接相关的关键基因和调控网络，同时可以通过基因敲除或过表达技术验证关键基因的功能。

4　结　论

本研究采用生理指标测定与转录组测序相结合的方法，系统探究了在高温胁迫下豌豆的生理响应和基因表达变化，结果如下。

1）高温胁迫显著影响豌豆的叶绿素含量、抗氧化酶活性、脯氨酸含量和蛋白含量等生理指标，且不同豌豆品种的耐高温能力存在显著差异。通过主成分分析、隶属函数分析和聚类分析，筛选出云豌59号、滇豌1号、中豌6号和嫩苔8号4个耐高温品种。

2）基于中豌6号的转录组分析，初步揭示了该品种在高温胁迫下的分子响应机制，高温胁迫下豌豆叶片中大量基因表达发生显著变化，且随胁迫时间延长，差异表达基因数量显著增加。KEGG功能富集分析显示，MAPK信号通路、核糖体通路、硫代谢通路等在高温胁迫下显著富集。GO功能富集分析表明，差异基因主要参与细胞过程、代谢过程、刺激反应等生物学过程，以及抗氧化活性、翻译调节活性等分子功能，筛选出热休克蛋白基因、核酮糖二磷酸羧化酶基因和糖基水解酶基因等与豌豆高温胁迫响应密切相关。

[参考文献]

[1] ZHAO C，LIU B，PIAO S L，et al. Temperature increase reduces global yields of major crops in four independent estimates [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America，2017，114(35)：9326-9331.

[2] JANANI R，SHARMA B B，DHAR S，et al. Physiological and biochemical responses of garden pea genotypes under reproductive stage heat stress [J]. Genetic Resources and Crop Evolution，2024，71(3)：1177-1200.

[3] LAMICHANEY A，PARIHAR A K，HAZRA K K，et al. Untangling the influence of heat stress on crop phenology，seed set，seed weight，and germination in field pea (*Pisum sativum* L.) [J]. Frontiers in Plant Science，2021，12：635868.

[4] RIDGE P E，PYE D L. The effects of temperature and frost at flowering on the yield of peas grown in a Mediterranean environment[J]. Field Crops Research，1985，12：339-346.

[5] PARK D J，KIM D H，YONG S H，et al. Establishment of efficient method for evaluation of heat stress tolerance of herbaceous plant species and selection of heat-tolerant plants[J]. Horticulturae，2024，10(12)：1290.

[6] HASANUZZAMAN M，NAHAR K，ALAM M，et al. Physiological，biochemical，and molecular mechanisms of heat stress

tolerance in plants[J]. International Journal of Molecular Sciences,2013,14(5):9643-9684.

[7] MITCHELL D,SCHÖNBECK L,SHAH S,et al. Leaf drought and heat tolerance are integrated across three temperate biome types[J]. Scientific Reports,2025,15:12201.

[8] MOURTZINIS S,SPECHT J E,LINDSEY L E,et al. Climate-induced reduction in US-wide soybean yields underpinned by region-and in-season-specific responses[J]. Nature Plants,2015,1(2):14026.

[9] WAHID A,GELANI S,ASHRAF M,et al. Heat tolerance in plants:an overview[J]. Environmental and Experimental Botany,2007,61(3):199-223.

[10] WRIGHT I J,DONG N,MAIRE V,et al. Global climatic drivers of leaf size[J]. Science,2017,357(6354):917-921.

[11] LIAO J L,ZHOU H W,PENG Q,et al. Transcriptome changes in rice (*Oryza sativa* L.) in response to high night temperature stress at the early milky stage[J]. BMC Genomics,2015,16(1):18.

[12] GONZÁLEZ-SCHAIN N,DRENI L,LAWAS L M F,et al. Genome-wide transcriptome analysis during anthesis reveals new insights into the molecular basis of heat stress responses in tolerant and sensitive rice varieties[J]. Plant and Cell Physiology,2016,57(1):57-68.

[13] ZHAO P,WANG D D,WANG R Q,et al. Genome-wide analysis of the potato Hsp20 gene family:identification,genomic organization and expression profiles in response to heat stress[J]. BMC Genomics,2018,19(1):61.

[14] FREY F P,URBANY C,HÜTTEL B,et al. Genome-wide expression profiling and phenotypic evaluation of European maize inbreds at seedling stage in response to heat stress[J]. BMC Genomics,2015,16(1):123.

[15] 王栋. 豌豆种质耐热筛选与耐热基因发掘[D]. 北京:中国农业科学院,2022.
WANG D. Heat tolerance screening and heat tolerant gene mining in pea (*Pisum sativum* L.) germplasm[D]. Beijing:Chinese Academy of Agricultural Sciences,2022.

[16] DEVI J,SAGAR V,MISHRA G P,et al. Heat stress tolerance in peas (*Pisum sativum* L.):current status and way forward[J]. Frontiers in Plant Science,2023,13:1108276.

[17] 侯赵玉,龚亦钊,钱祎,等. 芍药耐热性评价及其鉴定指标筛选[J]. 中国农业科学,2023,56(23):4742-4756.
HOU Z Y,GONG Y Z,QIAN Y,et al. Evaluation of heat tolerance of herbaceous peony and screening of its identification indices[J]. Scientia Agricultura Sinica,2023,56(23):4742-4756.

[18] 靳路真,王洋,张伟,等. 大豆品种(系)耐热性鉴定及分级评鉴[J]. 中国油料作物学报,2016,38(1):77-87.
JIN L Z,WANG Y,ZHANG W,et al. Grading evaluation on heat-tolerance in soybean and identification of heat-tolerant cultivars[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences,2016,38(1):77-87.

[19] LOVE M I,HUBER W,ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. Genome Biology,2014,15(12):550.

[20] ASHBURNER M,BALL C A,BLAKE J A,et al. Gene Ontology:tool for the unification of biology[J]. Nature Genetics,2000,25(1):25-29.

[21] MINORU K,MICHIHIRO A,SUSUMU G,et al. KEGG for linking genomes to life and the environment[J]. Nucleic Acids Research,2008,36:480-484.

[22] FANG C,MA Y M,WU S W,et al. Genome-wide association studies dissect the genetic networks underlying agronomical traits in soybean[J]. Genome Biology,2017,18(1):161.

[23] KIM D,LANGMEAD B,SALZBERG S L. HISAT:a fast spliced aligner with low memory requirements[J]. Nature Methods,2015,12(4):357-360.

[24] 孙永江,王琪,邵琪雯,等. 高温胁迫对植物光合作用的影响研究进展[J]. 植物学报,2023,58(3):486-498.
SUN Y J,WANG Q,SHAO Q W,et al. Research advances on the effect of high temperature stress on plant photosynthesis[J]. Chinese Bulletin of Botany,2023,58(3):486-498.

[25] 李培华,李杰,孟祥宇,等. 高温胁迫下冷型小麦的抗逆性评估及其生理响应研究[J]. 作物学报,2025,51(4):1118-1130.
LI P H,LI J,MENG X Y,et al. Evaluation of stress tolerance and physiological response of cold-type wheat under heat stress[J]. Acta Agronomica Sinica,2025,51(4):1118-1130.

[26] 李佳佳,龙群,朱尚尚,等. 大豆芽期耐高温评价方法构建及耐高温种质资源筛选[J]. 作物学报,2023,49(11):2863-2875.
LI J J,LONG Q,ZHU S S,et al. Construction of evaluation method for tolerance to high-temperature and screening of heat-tolerant germplasm resources of bud stage in soybean[J]. Acta Agronomica Sinica,2023,49(11):2863-2875.

[27] LI J J,WU M Y,CHEN H R,et al. An integrated physiological indicator and transcriptomic analysis reveals the response of soybean buds to high-temperature stress[J]. BMC Plant Biology,2024,24(1):1102.

[28] HE X W,WANG C Z,WANG H B,et al. The function of MAPK cascades in response to various stresses in horticultural plants[J]. Frontiers in Plant Science,2020,11:952.

[29] DARRIERE T,JOBET E,ZAVALA D,et al. Upon heat stress processing of ribosomal RNA precursors into mature rRNAs is compromised after cleavage at primary P site in *Arabidopsis thaliana*[J]. RNA Biology,2022,19(1):719-734.

[30] HACHAM Y,KAPLAN A,COHEN E,et al. Sulfur metabolism under stress:oxidized glutathione inhibits methionine biosynthesis by destabilizing the enzyme cystathionine γ-synthase[J]. Journal of Integrative Plant Biology,2025,67(1):87-100.

[31] MEI R,YANG H H,GUO C L,et al. Effects of high light exposure and heterologous expression of β-carotene ketolase on the metabolism of carotenoids in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology,2025,13:1533661.

(下转第120页)