

基于转录组测序筛选新疆野苹果种子休眠解除过程中植物激素相关基因

房 震, 李 静, 马 娟, 张 凯, 叶春秀*

(新疆农业大学林学与风景园林学院, 乌鲁木齐 830052)

摘要:【目的】研究新疆野苹果(*Malus sieversii*)种子不同贮藏阶段转录组差异和激素含量变化,筛选新疆野苹果种子休眠解除过程中植物激素相关基因,为后续新疆野苹果种子休眠解除激素调控机制研究提供依据。【方法】以新疆野苹果种子为材料,对照未层积种子和经4℃低温沙藏层积处理(30、60、90、120 d)后种子进行转录组测序,采用酶联免疫吸附法测定种子中的脱落酸(abscisic acid, ABA)、赤霉素(gibberellin, GA)、生长素(auxin, IAA)、细胞分裂素(cytokinin, CTK)含量以及乙烯氨基环丙烷羧酸氧化酶(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase, ACO)和氨基环丙烷羧酸合成酶(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, ACS)的活性。【结果】新疆野苹果种子GA、IAA、CTK含量随贮藏时间的增加呈上升趋势,而ABA含量呈下降趋势。乙烯(ethylene, ETH)合成途径ACO和ACS活性随贮藏时间的增加呈增强趋势。GO富集分析筛选出85个差异基因调控种子萌发(GO:0010029),114个GA相关差异基因,313个ABA相关差异基因和156个ETH相关差异基因。KEGG通路富集分析显示,主要富集通路有植物激素信号转导、MAPK信号通路-植物、内质网中的蛋白加工、淀粉和蔗糖代谢、糖酵解/糖原生成等。ABA信号传导通路中有3个PYR/PYL基因下调表达,2个蛋白磷酸酶2C(PP2C-type protein phosphatases, PP2C)、3个蔗糖非发酵相关的蛋白激酶(sucrose non-fermenting-1-related protein kinase 2, SnRK2)上调表达和2个ABA分解代谢8'-羟化酶(8'-hydroxylases)基因表达显著上调。GA信号转导途径中2个受体GID1(gibberellin insensitive dwarf 1)和6个负调控因子DELLA蛋白上调表达;ETH受体ETR(Ethylene receptor)的直接前体1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC)和ACO基因上调表达。【结论】新疆野苹果种子经低温沙藏层积处理,*ERF2-like*表达量与ACO、ACS活性变化呈相反趋势,*PYRI-like*、*WRKY33*基因表达量与ABA含量变化均下降,说明以上基因可能参与ABA信号通路调控新疆野苹果种子休眠解除过程。

关键词:新疆野苹果; 转录组; 内源激素; 差异表达基因; 种子休眠

中图分类号:S661.1

文献标志码:A

文章编号:1009-9980(2024)10-1961-18

Screening of plant hormone-associated genes during seed dormancy release in *Malus sieversii* based on transcriptome sequencing

FANG Zhen, LI Jing, MA Juan, ZHANG Kai, YE Chunxiu*

(College of Forestry and Landscape Architecture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang, China)

Abstract:【Objective】The study aimed to study the transcriptome differences and hormone content changes of the seeds of *Malus sieversii* at different stages of stratification in order to screen the plant hormones genes related to dormancy release and provide a basis for subsequent studies on the hormonal regulation mechanism of seed dormancy release in *M. sieversii*. 【Methods】The seeds of *M. sieversii* were used as materials, transcriptome sequencing was performed on the seeds at different stages of the stratification at 4℃ (0, 30, 60, 90 and 120 d). The content of abscisic acid (ABA), gibberellins (GA), auxin (IAA), cytokinin (CTK), the activities of ethylene 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase

收稿日期:2024-04-09 接受日期:2024-08-05

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目(2023D01A28);新疆农业大学高层次人才引进项目(2521GCCRC)

作者简介:房震,男,在读硕士研究生,研究方向为林木遗传育种。E-mail:fz199971@163.com

*通信作者 Author for correspondence. E-mail:yecx2008@163.com

(ACO) and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase synthase (ACS) were measured using an enzyme-linked immunosorbent assay. 【Results】 The ABA content of the seeds showed a decreasing trend with the increase of stratification time, the maximum content was $80.22 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ on 0 d of the storage, the content on 60 d of the storage was significantly lower than that at the three periods of 0, 30 and 90 d ($p < 0.05$), the content reached a minimum of $43.67 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ on 120 d. The GA content showed an increasing trend with the increase of the storage time, the content was the lowest at $78.42 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1}$ on 0 d, and the content on 120 d significantly higher than those of the other periods ($p < 0.05$), and reached a maximum of $170.67 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1}$. The IAA content showed an increasing trend with the storage time, and the content on 90 d was significantly higher than those of the other periods, reaching a maximum value of $41.36 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$. The CTK content on 90 d was significantly higher than those of the other periods, reaching a minimum value of $43.67 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, it showed a decreasing trend in the storage time of 0–30 d, the content on 30 d was significantly lower than those of the other periods ($p < 0.05$), reaching a minimum value of $31.34 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, and showed an increasing trend in the storage time of 30–60 d, suggesting that CTK would promote the accumulation of seed assimilates in this period. The activities of ACC oxidase and ACC synthase in the ethylene biosynthesis pathway showed inconsistent trends during the storage. The activity of ACO was $262.52 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ on 90 d of the storage, which was significantly higher than that of other periods ($p < 0.05$), and the activity of ACO was the lowest on 30 d of the storage, which was $157.38 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$. The activity of ACS reached the maximum value of $418.92 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ on 120 d of the storage, which was significantly higher than that of the three periods of 0, 30 and 60 d ($p < 0.05$). It indicated that the stratification promoted the synthesis of GA, IAA, CTK, ACC oxidase and ACC synthase, and two enzymes of the ethylene synthesis pathway might be more sensitive to low temperature. There were more significant DEGs on M120d_CK120d compared with M0d_CK0d, M30d_CK30d, M60d_CK60d and M90d_CK90d, suggesting that there were more DEGs on M120d for the regulation of seed germination and physiological changes. There were a total of 7384, 4875 and 3236 significantly and differentially expressed genes, significantly and differentially up-regulated genes and significantly and differentially down-regulated genes on the M30d_CK30d and M60d_CK60d periods, respectively. The gene ontology enrichment of DEGs was performed, and the biological processes were mainly involved in the response to osmotic stress and water deprivation, abscisic acid response, response to salt stress, transcriptional regulation, regulation of seed germination, and gibberellin response. The cellular components were mainly chloroplast stroma, chloroplast envelope and thylakoid. The molecular functions were mainly related to DNA-binding transcription factor activity, phosphatase activity and protein homodimer activation. The multiple plant hormone biological processes remained active and changed during the course of stratification of the seeds, suggesting that they would play a role in seed dormancy release activities. The KEGG pathway enrichment analysis showed that the main pathways enriched in seeds at different periods of the stratification were plant hormone signaling, MAPK signaling pathway-plant, protein processing in endoplasmic reticulum, starch and sucrose metabolism, and glycolysis/glycogenesis. Among them, plant hormones would play a key role in regulating seed dormancy and germination in *M. sieversii*, and hormone signal transduction pathway-related genes such as ABA, GA, and ETH might be involved in the processes such as seed dormancy release. The starch and sucrose metabolic pathways were involved in the process of carbon metabolism in the seed embryo, providing carbon source for the seed embryo. The glycogen production metabolic pathway was involved in the synthesis and metabolism of cellular proteins, providing nitrogen source and energy for seed embryo germination. The ABA receptor PYR/PYL had 12 genes up-regulated and 3 genes down-regulated. The ABA signal

transducer protein phosphatases 2C (PP2C) and positive regulator GA receptor gibberellin insensitive dwarf 1 (GID1) genes were up-regulated. Three genes were up-regulated and one gene was down-regulated for the sucrose non-fermenting-1-related protein kinase 2 (SnRK2), and two genes were up-regulated for the ABA catabolic hydroxylases 8'-hydroxylases. The GA signaling the negatively regulated growth inhibitor DELLA protein was up-regulated by 6 genes and down-regulated by 1 gene, indicating that low-temperature stratification treatment enhanced GA signaling. The ETH and IAA were significantly and differentially expressed at different stratification stages of *M. sieversii* embryos. The ETH receptor ETR, ETHYLENE INSENSITIVE 3/EIN3-LIKE, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, a direct precursor of ETH, and ACO were up-regulated expression. The 5 IAA-related genes were up-regulated and one was down-regulated, and small auxin up-regulated RNA was up-regulated, indicating that the stratification would promote IAA synthesis. The cell cycle protein genes were up-regulated to meet the nutritional growth of the seed dormancy release. In addition, the genes related to sucrose metabolism were screened, sucrose synthase and endoglucanase were up-regulated during the stratification. The sucrose transport protein STP13 and STP14 were up-regulated, while STP5 and STP10 were down-regulated. 【Conclusion】 The expression of the *ERF2-like* showed an opposite trend to the changes of ACO and ACS activities, and the expression of the *PYRI-like* and *WRKY33* genes decreased in relation to the changes of ABA content, suggesting that the above genes might be involved in the ABA signaling pathway to regulate the process of dormancy release process of *M. sieversii* seeds.

Key words: *Malus sieversii*; Transcriptome; Endogenous hormone; Differentially expressed gene; Seed dormancy

新疆野苹果 [*Malus sieversii* (Ledeb.) Rome.] 主要分布在中亚天山山脉^[1], 是现代栽培苹果的祖先和珍贵的种质资源, 其种群遗传多样性丰富。作为世界苹果基因库的组成和中国栽培苹果的砧木之一^[2], 具有保护价值和研究意义^[3]。新疆野苹果种子休眠受到种皮结构及生理生化指标双重影响^[4], 进而影响新疆野苹果育种工作的推进和种质资源的维护。

目前转录组学已应用在 NaCl 胁迫下筛选新疆野苹果叶和根糖酵解途径相关基因, 发现磷酸丙糖异构酶(triosephosphate isomerase, TPI)、果糖-1,6 二磷酸酶(fructose-1,6-bisphosphatase, FBPase)、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶[phosphoenolpyruvate carboxy kinase (ATP), pckA]、丙酮酸磷酸双激酶(pyruvate, phosphate dikinase, PPDK)等基因的表达量显著变化^[5]。马红喜等^[6]筛选获得-3 °C 冻害新疆野苹果组培苗光合调控相关基因 *PsbQ* 与 *PsbY*。苏永峰等^[7]筛选新疆野苹果组培苗应答冻害谷胱甘肽代谢相关基因, 冻害胁迫响应与谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPX)和谷胱甘肽转硫酶(glutathione S-transferase, GST)表达上调有关。因此, 研究新疆野苹果种子休眠解除中的差异基因, 对苹果的

遗传育种及保护种质资源提供基因资源。

植物激素是植物产生的少量有机化合物, 可以促进或抑制多种生理过程^[8]。脱落酸(abscisic acid, ABA)和赤霉素(gibberellin, GA)在调控种子休眠和萌发中发挥主要作用, 种子中的 ABA 浓度除了控制 ABA 生物合成外, 还通过将 ABA 转化为相酸(phasic acid)导致 ABA 失活来决定, 负责转化是 ABA-8'-羟化酶(ABA-8'-hydroxylases), 它是由 *CYP707A1* 和 *CYP707A2* 编码的 2 个细胞色素 P450(cytochrome P450, CYP450)^[9]。Urbanova 等^[10]研究发现 3 种拟南芥 (*Arabidopsis*) GA 受体 GID1 (gibberellin insensitive dwarf 1) 与 GAI (GA-insensitive)、RGA (repressor-of-ga1-3)、RGL1 (RGA-like1)、RGL2、RGL3 等 5 种 DELLA 蛋白结合, 作为 GA 信号转导的阻遏物。其中 RGL1 在种子萌发中比 GAI 和 RGA 具有更重要的作用, 但 RGL2 是拟南芥中响应 GA 种子萌发最重要的调节因子。乙烯(ethylene, ETH)是另一种发芽促进剂, 减少休眠 3(reduced dormancy 3)是 ETH 受体反应因子 1(ethylene response factor 1, ETR1)的功能丧失突变体, ETR1 通过延迟休眠 1(delay of germination 1, DOG1) 乙烯部分途径控制种子休眠。ETR1 抑制 ERF12 的表达, ERF12 募集 TOP-

LESS 形成阻遏复合物并与 DOG1 启动子结合,从而抑制 DOG1 的表达解除种子休眠^[11]。马娟等^[12]发现新疆野苹果种子低温层积处理生长素(auxin, IAA)、GA₃、细胞分裂素(cytokinin, CTK)含量增加,ABA 含量降低,IAA、GA₃ 和 CTK 促进种子解除休眠。转录组筛选分析花生(*Arachis hypogaea*)种子休眠过程中的 ABA、GA、ETH、IAA 相关差异表达基因,ABA 合成和代谢基因调控花生种子休眠解除^[13]。紫荆(*Cercis chinensis* Bunge)种子休眠解除主要与植物激素信号转导和能量代谢通路差异基因的显著变化相关^[14]。对低温处理豆梨(*Pyrus calleryana* Dence)^[15]和强弱休眠花生种子^[16]进行转录组测序,表明植物激素(ABA、GA、ETH、IAA)的信号转导和生物合成在调控种子休眠维持和解除中起关键作用。前期的生理生化指标表明内源激素对种子休眠解除具有显著影响^[12]。笔者在本研究中以新疆野苹果种子为材料,选取未层积和低温沙藏层积处理(30、60、90、120 d)的种子进行转录组测序,同时测定种子中植物激素 ABA、GA、IAA、CTK 含量、乙烯氨基环丙烷羧酸氧化酶(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase, ACO)和氨基环丙烷羧酸合成酶(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase synthase, ACS)的活性,分析在低温层积过程中的激素变化,旨在揭示新疆野苹果种子休眠解除植物激素相关的关键基因,为解析种子休眠解除的激素调控机制提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料为新疆塔城额敏县野果林新疆野苹果 [*M. sieversii*(Ledeb.)Rome.] 种子,对照组为室温保存 5 个时期(0、30、60、90、120 d)的种子样品,处理组 M0d 是 CK0d 清水浸泡 24 h,4 °C 低温沙藏层积 4 个时期(30、60、90、120 d)的种子样品,标记为 M30d、M60d、M90d 和 M120d。样品迅速于液氮中冷冻,之后在-80 °C 超低温冰箱中保存备用。各时期种子 3 次生物学重复。种子萌发率测定,将层积不同时期的种子均匀摆放于培养皿脱脂棉表面,盖上皿盖置于自然光下,定期换水并观察种子发芽情况,各时期处理 30 粒种子,3 次重复。

1.2 植物激素和乙烯合成途径酶浓度检测

采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)测定

植物激素 ABA、GA、IAA、CTK 含量,ETH 合成途径 ACC 氧化酶和 ACC 合成酶活性,试剂盒购自睿信生物科技有限公司。

1.3 RNA 提取与转录组测序分析

所有新疆野苹果种子样本转录组测序分析委托新疆康普森有限公司。使用 Trizol 法提取 5 个时期种胚的总 RNA,检测 RNA 样品的浓度和完整性。完成转录组测序文库构建,使用 Illumina 平台进行 PE150 测序,得到 150 bp 的双端测序 reads。利用 Trimmomatic^[17]进行数据质量过滤,去除 read 中包含的接头序列和质量低于 20 的碱基,过滤后的数据按照长度进行筛选,去掉长度小于 50 bp 或者只有一端的 reads。过滤之后得到的高质量 reads 称为 Clean reads。金冠苹果参考基因组和基因模型注释文件直接从基因组网站下载,使用 Hisat2^[18] v2.0.5 建立参考基因组索引,将成对的 Clean reads 与苹果参考基因组进行比对,获得 Mapped Data。根据基因长度和 Htseq-count 统计映射到该基因上的读数,计算出每个基因的每百万碱基对测序的转录本序列片段数(fragments per kilobase of transcript sequence per millions base pairs sequenced, FPKM)进行基因表达量的量化。

1.4 差异表达分析、DEGs 功能注释和富集分析

差异表达分析使用 DESeq2^[19],采用皮尔逊(Pearson)相关系数作为生物重复之间的相关性指标^[20]。通过 DESeq2 发现 $\text{Padj} < 0.05$ 的基因被归为普通差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)。研究各组合的显著差异表达基因,选取错误发现率(false discovery rate, FDR) < 0.05 且差异倍数 $|\log_2(\text{Fold Change})| \geq 2$ 作为筛选标准。采用层次聚类分析 DEGs 的表达模式,并将 DEGs 与基因本体(gene ontology, GO)^[21] 和 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)^[22] 数据库比较,使用 topGO R 和 clusterProfiler R^[23] 软件包来测试 GO 和 KEGG 通路中 DEGs 的统计富集,通过 KEGG 通路显著性富集来确定植物激素相关差异表达基因。

1.5 差异表达转录因子分析

通过植物转录因子数据库(plant transcription factor database, PTFDB)与 DEGs 进行比对,筛选差异表达转录因子(transcription factor, TFs)。采用皮尔逊相关系数作为转录因子与植物激素有关 DEGs 的相关性指标,利用 TBtools^[24]绘制热图分析差异转

录因子的表达模式。

1.6 qRT-PCR验证

随机选择与种子休眠和激素相关的9个DEGs进行实时荧光定量(qRT-PCR),使用Primer 5设计引物(表1)。以不同时期的新疆野苹果种子RNA为

模板,使用SYBR Green I染料法qPCR预混液(Enzy Artisan, Q204)进行qRT-PCR:反应条件为预变性95 °C 30 s;三步扩增95 °C 10 s;60 °C 15 s;72 °C 30 s;40个循环;溶解95 °C 10 s;60 °C 60 s;95 °C 15 s;冷却37 °C 30 s。以 β -actin为内参基因,根据 $2^{\Delta\Delta Ct}$ 算

表1 用于验证转录组数据的qRT-PCR引物

Table 1 qRT-PCR primers used to validate transcriptome data

基因名称 Gene name	正向引物(5'-3') Forward primers (5'-3')	反向引物(3'-5') Reverse primers (3'-5')
<i>MsMYB1R1</i>	CACCAACCGATACCCCTTGAAT	CGGGAAAGTCGAAACTGGAAAC
<i>MsWRKY21</i>	GCATCAATGCATCAGGACAGG	ATTGGCATTCCACCAGAGCAT
<i>MsERF2-like</i>	GGCAGCAACGCCAACAAAT	GTGGGCTCGTGAACCTTCGTT
<i>MsWRKY53</i>	AATGGGAAATATGTGCTTCTGATT	GCCGAATTGCCATGCTGTG
<i>MsWRKY51</i>	AAGCGGTCAAGAACAGCCTCA	CCAGCGAAGTAACCAAGTATTCA
<i>MsWRKY31</i>	GCCTGTAACGCTCGATCTCA	TGCTTGAGGGCTTCCAAT
<i>MsWRKY17</i>	GCGCCCTATCCAATCATCCCC	TTGTCACGGTGAAGTCGGTG
<i>MsWRKY33</i>	CCACAGCCACAAAGGCAATC	TGCTGCTAGTACCCCCATTG
<i>MsPYRI-like</i>	ATCCTACGTCGTCGATCTGC	GAGCAAACGTGGCAAGAAAGA
β -actin	CAGCATCACTACCACATCTGCAAC	CCGCCATCTTCTACTCCTGTT

法^[25]计算相对表达量,每个处理3次重复。

1.7 数据分析

使用Excel进行数据统计,使用SPSS 25 Duncan新复极差法进行差异显著性检验,使用Origin 2022软件绘图。

2 结果与分析

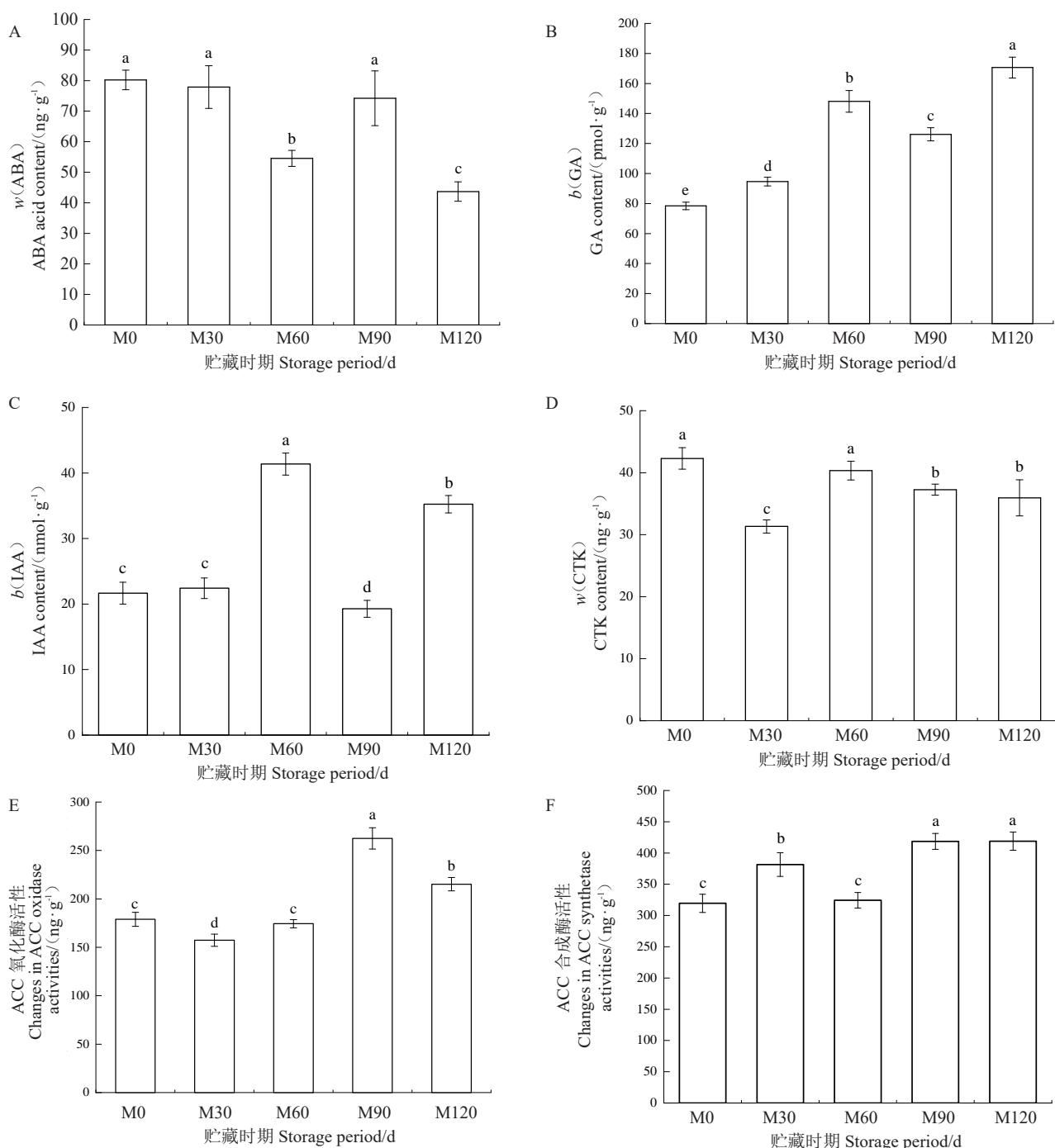
2.1 新疆野苹果种子不同贮藏时期植物激素含量、酶活性及萌发率比较

新疆野苹果种子ABA含量随贮藏时间的增加呈下降趋势(图1-A),贮藏0 d时ABA含量(w,后同)最高为80.22 ng·g⁻¹,在贮藏60 d时ABA含量显著低于0、30、90 d三个时期($p<0.05$),120 d时ABA含量达到最低为43.67 ng·g⁻¹;GA含量随贮藏时间的增加呈上升趋势(图1-B),贮藏0 d时GA含量(b,后同)最低为78.42 pmol·g⁻¹,120 d时GA含量显著高于其他时期($p<0.05$),达到最高为170.67 pmol·g⁻¹;IAA含量随贮藏时间的增加呈上升趋势(图1-C),贮藏60 d时IAA含量显著高于其他时期,达到高41.36 nmol·g⁻¹;CTK含量在贮藏时间0~30 d时呈下降趋势(图1-D),贮藏30 d时CTK含量显著低于其他时期($p<0.05$),达到最低值为31.34 ng·g⁻¹,在贮藏30~60 d时CTK含量呈显著上升趋势;表明该时期CTK能促进种子同化物的积累。ETH生物合成途径

中的ACC氧化酶(ACO)和ACC合成酶(ACS)两个关键酶在贮藏过程中的活性变化趋势不一致(图1-E,F)。在贮藏90 d时,ACO活性为262.52 ng·g⁻¹,显著高于其他时期($p<0.05$),贮藏30 d时,ACO活性最低为157.38 ng·g⁻¹。ACS的活性在贮藏120 d时达到最大值418.92 ng·g⁻¹,显著高于0、30、60 d三个时期($p<0.05$)。说明低温沙藏层积促进GA、IAA、CTK、ACC氧化酶和ACC合成酶的合成,且ETH合成途径的两个酶可能对低温更加敏感。种子萌发率在低温沙藏层积30、60、90、120 d时萌发率分别为0%、7%、95%、100%。种子萌发率与GA、IAA含量及ACO活性变化趋势一致,与ABA含量变化趋势相反。

2.2 层积期间种子的转录组测序数据

五个休眠解除时期总共得到209.45 G的高质量数据(表2),各样本Q30碱基百分比均高于92.9%,说明样品测序数据以及从头组装后的质量较高。将优化后的高质量数据序列与金冠苹果(*M. domestica*)的参考基因组进行比对(表3),比对效率为85.09%~94.06%,比对效率经分析后如果高于70%,说明所选参考基因组可满足信息分析需求。reads在参考基因组不同区域的分布情况,每个样品没有比对到基因间区的reads在5.94%~26.81%,可能来源于ncRNA或少许DNA片段污染;reads在基因组外显子区域在66.44%~91.47%,说明物种的参考基



A. ABA 含量变化; B. GA 含量变化; C. IAA 含量变化; D. CTK 含量变化; E. ACC 氧化酶活性变化; F. ACC 合成酶活性变化; 不同小写字母表示不同处理间的差异($p < 0.05$)

A. Changes in abscisic acid content; B. Changes in gibberellin content; C. Changes in auxin content; D. Changes in cytokinin content; E. Changes in ACC oxidase activities; F. Changes in ACC synthetase activities; Different small letters indicate significant difference among different treatments ($p < 0.05$).

图 1 新疆野苹果种子不同贮藏时期植物激素含量和酶活性的变化

Fig. 1 Changes in plant hormone contents and enzyme activities of *M. sieversii* seeds during different storage periods

因注释较为完善。

在差异表达分析时使用 Pearson 相关系数进行计算,样品间基因表达水平相关性是检验试验可靠

性和样本选择是否合理的重要指标。根据各样本所有基因的FPKM值计算组内及组间样本的相关性系数,绘制成熟热图(图2),可直观显示组间样本差异及

表2 测序数据质量统计

Table 2 Statistics of sequencing quality date

样本 Sample	原始数据 Raw reads	过滤后数据 Clean reads	碱基 Base/G	GC含量 GC content/%	碱基质量大于30占比 Q30/%	平均质量值 Average quality
CK0d1	60 563 404	57 938 298	9.085	47.990	93.680	35.900
CK0d2	46 973 466	44 451 036	7.046	49.755	94.055	35.925
CK0d3	47 036 158	44 412 908	7.055	49.625	94.125	35.920
CK30d1	47 513 250	45 644 342	7.127	48.180	94.750	36.080
CK30d2	45 086 322	42 348 940	6.763	48.865	93.775	35.870
CK30d3	43 997 912	42 207 250	6.600	49.855	94.290	35.990
CK60d1	43 504 982	41 868 734	6.526	48.495	94.960	36.120
CK60d2	43 786 232	40 897 746	6.568	48.485	93.035	35.735
CK60d3	48 114 592	45 700 496	7.217	49.465	94.140	35.935
CK90d1	41 310 866	39 550 982	6.197	48.330	94.215	35.990
CK90d2	76 316 530	73 129 800	11.447	52.220	94.425	36.010
CK90d3	45 211 020	43 101 786	6.782	49.455	93.935	35.910
CK120d1	49 435 970	47 272 450	7.415	48.075	94.535	36.030
CK120d2	55 695 568	53 222 602	8.354	48.400	94.555	36.035
CK120d3	51 391 678	48 948 266	7.709	48.330	94.425	36.000
M0d1	44 957 960	43 428 624	6.744	48.695	94.620	36.065
M0d2	49 528 436	47 568 094	7.429	49.215	94.480	36.030
M0d3	57 739 050	55 294 880	8.661	49.505	94.345	36.000
M30d1	38 993 450	37 739 124	5.849	47.740	95.360	36.205
M30d2	56 245 022	54 442 986	8.437	47.445	95.105	36.150
M30d3	42 345 624	40 832 692	6.352	47.560	94.600	36.060
M60d1	48 499 446	46 970 016	7.275	46.875	95.065	36.145
M60d2	55 527 058	53 742 160	8.329	47.795	94.625	36.070
M60d3	51 803 820	50 201 188	7.771	46.540	94.540	36.070
M90d1	49 383 852	48 796 302	7.389	47.250	92.450	35.900
M90d2	52 726 988	52 093 942	7.885	47.565	92.755	35.950
M90d3	44 770 750	44 227 422	6.698	47.225	92.670	35.935
M120d1	52 002 310	49 080 220	7.800	46.735	92.690	35.725
M120d2	48 754 838	46 407 066	7.313	46.845	94.305	35.985
M120d3	43 980 026	42 092 510	6.597	46.860	94.555	36.040

表3 比对效率统计

Table 3 Comparative efficiency statistics

样本 Sample	过滤后的总 reads 数 Total reads after filtered	比对到参考基因组上的 reads 数 Mapped on reference	没有比对到参考基因组上的 read 数 Unmapped	比对到多处的 reads 数 Multimapped	非剪接比对 reads 数 Non-splice reads	剪接比对 reads 数 Splice reads
CK0d	48 934 081	46 016 689(94.06%)	2 917 392(5.94%)	3 535 045(3.04%)	30 039 842(61.38%)	12 441 801(25.07%)
CK30d	43 400 177	40 569 158(93.47%)	2 831 020(6.53%)	2 719 071(3.07%)	26 397 911(60.87%)	11 452 176(26.27%)
CK60d	42 822 325	39 981 066(93.37%)	2 841 259(6.64%)	2 229 351(3.01%)	25 757 060(60.15%)	11 994 655(28.03%)
CK90d	51 927 523	48 586 942(93.39%)	3 340 581(6.62%)	6 564 208(3.18%)	30 937 262(59.96%)	11 085 472(22.69%)
CK120d	49 814 439	46 717 955(93.78%)	3 096 485(6.22%)	1 903 722(3.38%)	28 759 241(57.73%)	16 054 992(32.23%)
M0d	48 763 866	45 875 666(94.06%)	2 888 200(5.94%)	1 701 050(2.71%)	29 358 870(60.07%)	14 815 746(30.48%)
M30d	44 338 267	41 368 001(93.35%)	2 970 267(6.65%)	1 368 559(2.89%)	23 431 366(52.77%)	16 568 075(37.46%)
M60d	50 304 455	45 519 192(90.52%)	4 785 263(9.48%)	1 456 204(4.87%)	25 977 318(51.67%)	18 085 670(35.95%)
M90d	48 372 555	41 114 114(85.09%)	7 258 441(14.94%)	1 406 065(7.06%)	23 115 454(47.80%)	16 592 595(34.39%)
M120d	45 859 932	41 868 585(91.29%)	3 991 347(8.71%)	1 359 501(4.50%)	23 306 853(50.84%)	17 202 231(37.50%)

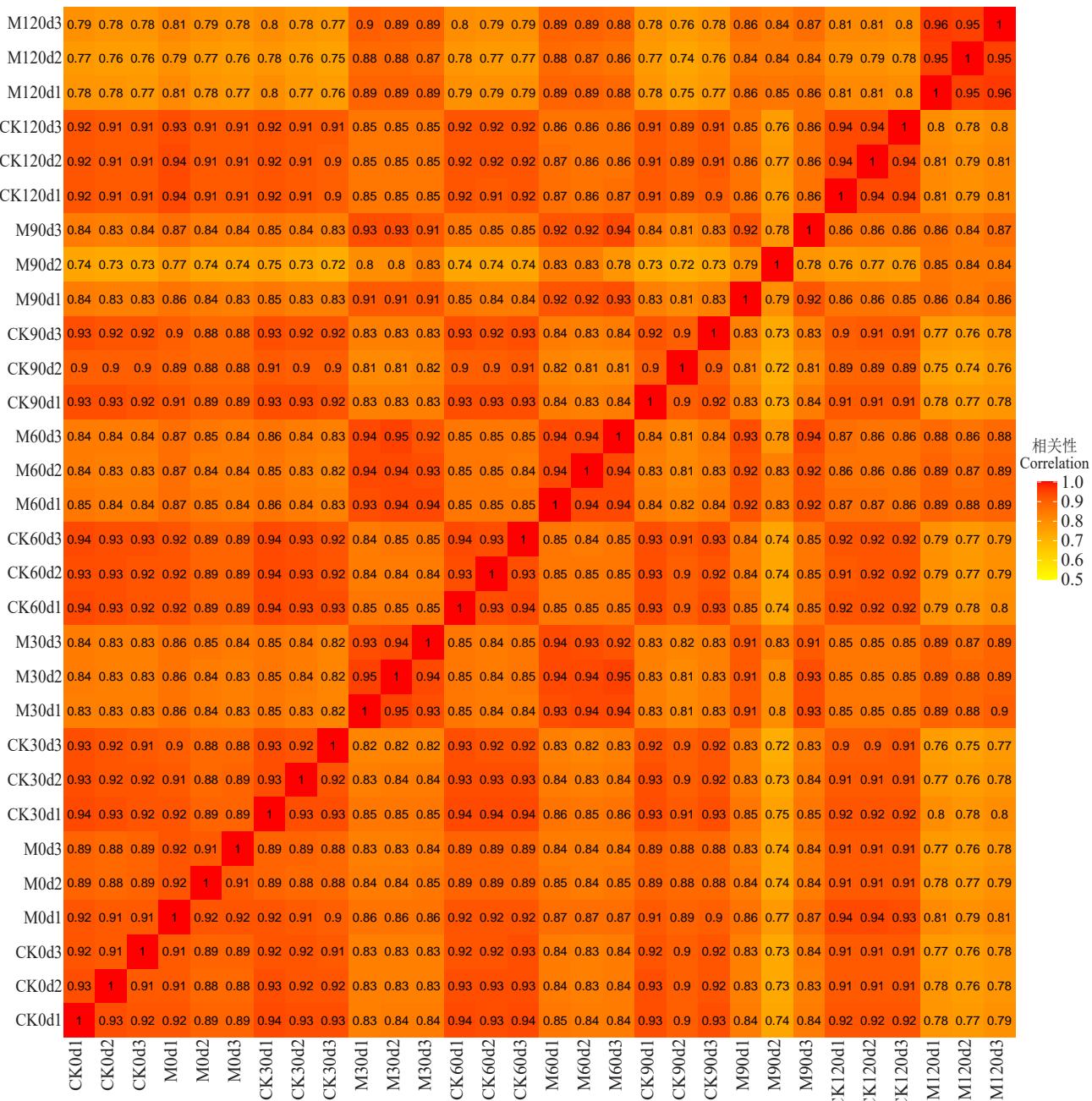


图 2 新疆野苹果种子低温沙藏层积不同时期样品间的表达量相关系数热图

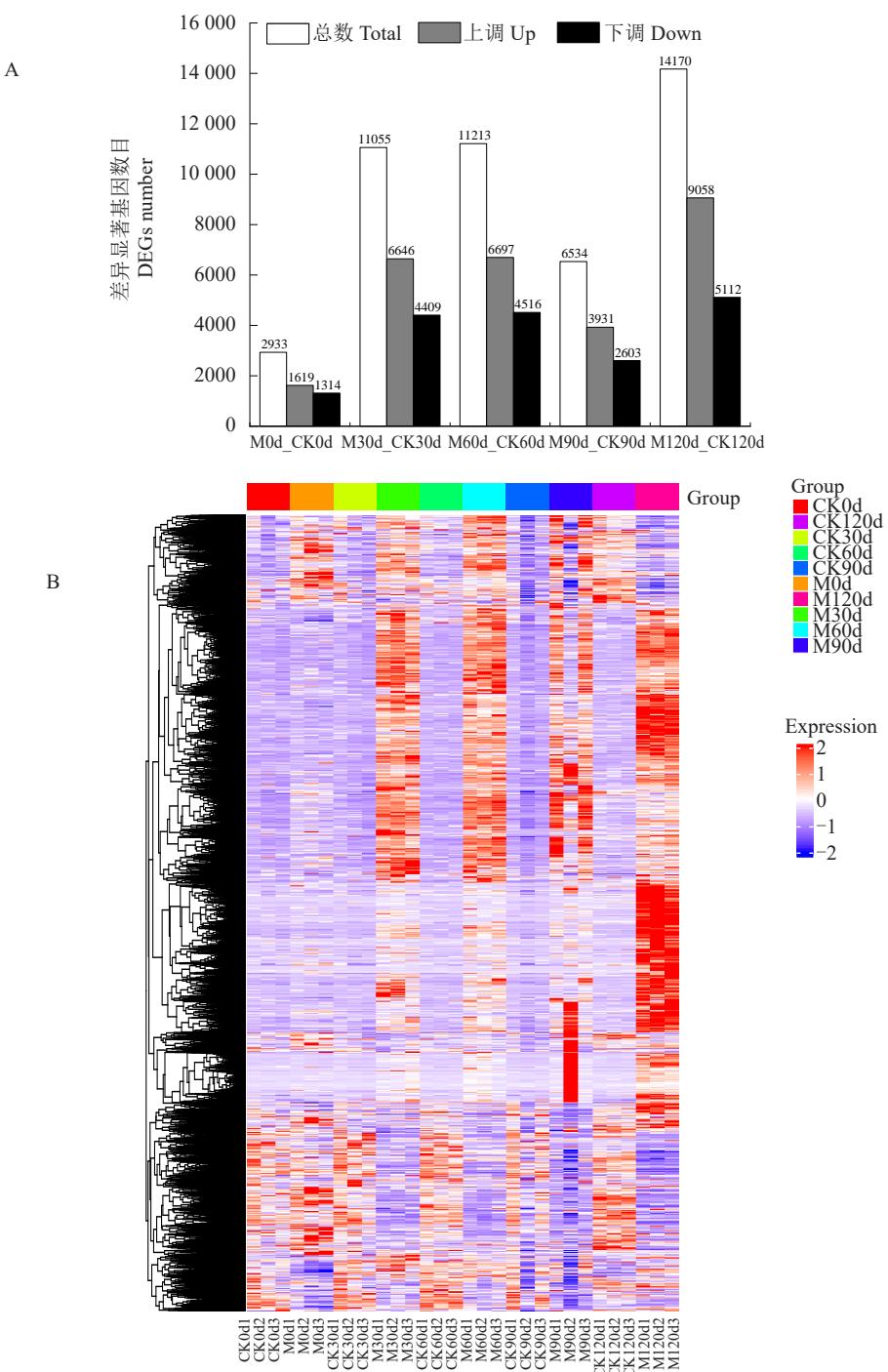
Fig. 2 Heat map of expression correlation coefficients between samples at different stages of low-temperature sand storage stratification of *M. sieversii* seeds

组内样本重复情况。不同颜色代表皮尔逊相关系数的大小,颜色越偏向红色代表样品间相关系数的绝对值越大。生物学重复样品间 R^2 均大于0.7,相关系数越接近1,表明样品之间表达模式的相似度越高。相关性分析确保后续的差异基因分析得到更可靠的结果。

2.3 显著差异基因分析

显著差异基因分析表明 DEGs 在低温层积过程中显著富集(图 3-A)。M120d CK120d 相对于

M0d_CK0d 和 M30d_CK30d、M60d_CK60d 和 M90d_CK90d 中有更多的显著 DEGs，这表明 M120d 中具有更多的 DEGs 来调控种子萌发和生理变化。使用 R 软件包 pheatmap 进行基因和样品的双向层次聚类分析（图 3-B），同处理不同重复间的基因表达模式相似，可能功能相似或参与生物学过程相同，而同时期不同处理间差异基因表达模式存在较大差异。韦恩图展示了层积和对照比较组合共有或独有的差异基因数（图 4）。M30d_CK30d 与 M60d_CK60d 时



A. 显著差异表达基因统计, 横坐标是不同的组合; B. 显著差异基因表达模式聚类。

A. Significantly DEGs statistics, horizontal coordinates are different combinations; B. Significantly DEGs expression pattern clustering.

图3 各对比组合显著差异表达基因统计图和聚类图

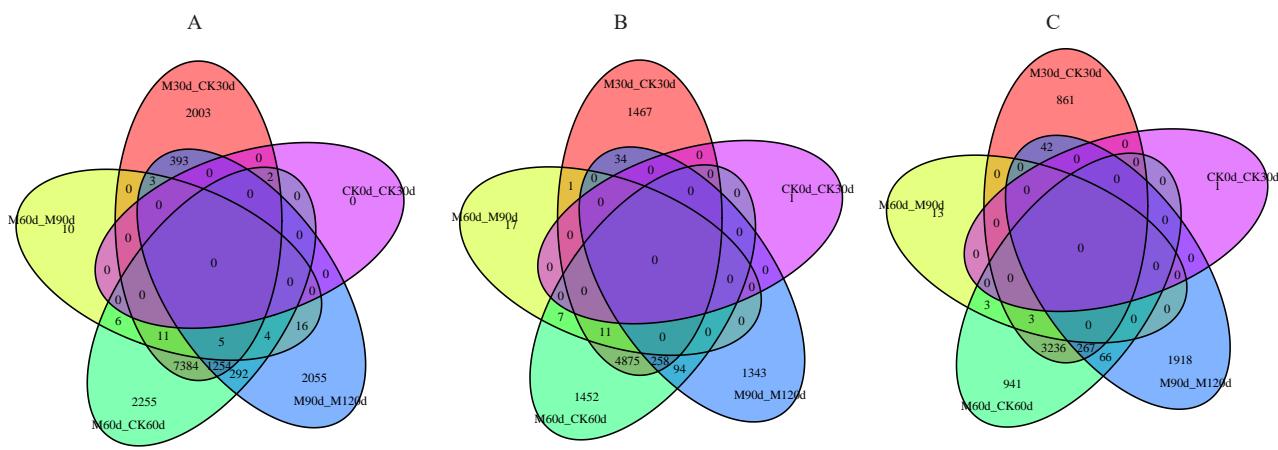
Fig. 3 Statistical and clustering maps of significantly DEGs in each comparative combination

期显著差异表达基因、显著差异上调基因和显著差异下调基因分别共有 7384、4875 和 3236 个, 表明在低温层积两个时期(M30d_CK30d 与 M60d_CK60d)之间有更多的显著差异基因参与种子休眠解除。

2.4 DEGs 功能注释和富集分析

对差异基因进行显著富集 GO 条目(表 4)分析,

进一步了解 DEGs 的生物学功能。在生物过程中, 有 85 个 DEGs 富集在调控种子萌发(GO:0010029), 调控种子萌发中有 45 个 DEGs 下调表达, 40 个 DEGs 上调表达; 在赤霉素响应(GO:0009739)和脱落酸响应(GO:0009737)中分别有 114 个和 313 个 DEGs, 其中赤霉素响应中有 60 个 DEGs 上调表达,



A. 显著差异基因图; B. 显著上调表达差异基因图; C. 显著下调表达差异基因图。

A. Graphs of significantly DEGs; B. Graphs of significantly up-regulated DEGs; C. Graphs of significantly down-regulated DEGs.

图 4 低温沙藏层积处理不同时期显著差异表达基因韦恩图

Fig. 4 Venn diagram of significantly DEGs in different periods of low-temperature sand storage stratification treatment

表 4 低温沙藏层积下新疆野苹果种子中显著富集的 GO 条目

Table 4 Significantly enriched GO entries in *M. sieversii* seeds under low-temperature sand storage stratification

GO 条目 GO terms	注释描述 Annotation description	p 值 p-value	上调基因数 Up-regulated count	下调基因数 Down-regulated count
GO:0010029	调控种子萌发 Regulation of seed germination	2.50E-06	40	45
GO:0009739	赤霉素响应 Response to gibberellin	3.10E-05	60	54
GO:0009737	脱落酸响应 Response to abscisic acid	0.000 24	169	144
GO:0009723	乙烯响应 Response to ethylene	0.012 68	99	57
GO:0003700	DNA 结合转录因子活性 DNA-binding transcription factor activity	1.20E-05	449	294
GO:0009941	叶绿体薄膜 Chloroplast envelope	2.70E-07	271	89

54 个 DEGs 下调表达; 其中脱落酸响应中有 169 个 DEGs 上调表达, 144 个 DEGs 下调表达; 富集在乙烯响应有 156 个 DEGs, 99 个 DEGs 上调表达, 57 个下调表达。分子功能中, 富集 DEGs 最高的是 DNA 结合转录因子活性 (GO:0003700), 449 个上调表达, 294 个下调表达。细胞组成中, 叶绿体薄膜 (GO:0009941) 中有 271 个上调表达, 89 个下调表达。说明植物激素相关调控基因对种子休眠与萌发的影响较大。

对 DEGs 进行 GO 富集 (图 5), 生物过程主要参与渗透压和缺水的反应、脱落酸响应、盐胁迫的反应、转录调控、调控种子萌发和赤霉素响应等。细胞组分主要有叶绿体基质、叶绿体包膜和类囊体。分子功能主要与 DNA 结合转录因子活性、磷酸酶活性和蛋白质同源二聚体活化有关。新疆野苹果种子低

温层积休眠解除过程中, 多个植物激素生物学过程保持活跃变化, 表明植物激素在种子休眠解除活动中发挥作用。

KEGG 通路富集分析显示 (图 6), 种子在不同时期低温沙藏层积过程中, 主要富集的通路有植物激素信号转导、MAPK 信号通路-植物、内质网中的蛋白加工、淀粉和蔗糖代谢、糖醇解/糖原生成等。ABA、GA、ETH 等激素信号转导通路相关基因参与种子休眠解除等过程, 淀粉和蔗糖代谢通路参与种胚的碳代谢过程, 为种胚提供营养物质。糖原生成代谢通路参与细胞蛋白质的合成和代谢过程, 为种胚萌发提供氮源和能量。

2.5 植物激素信号转导和代谢差异表达基因的筛选

根据 KEGG 通路分析, 筛选在植物激素信号转

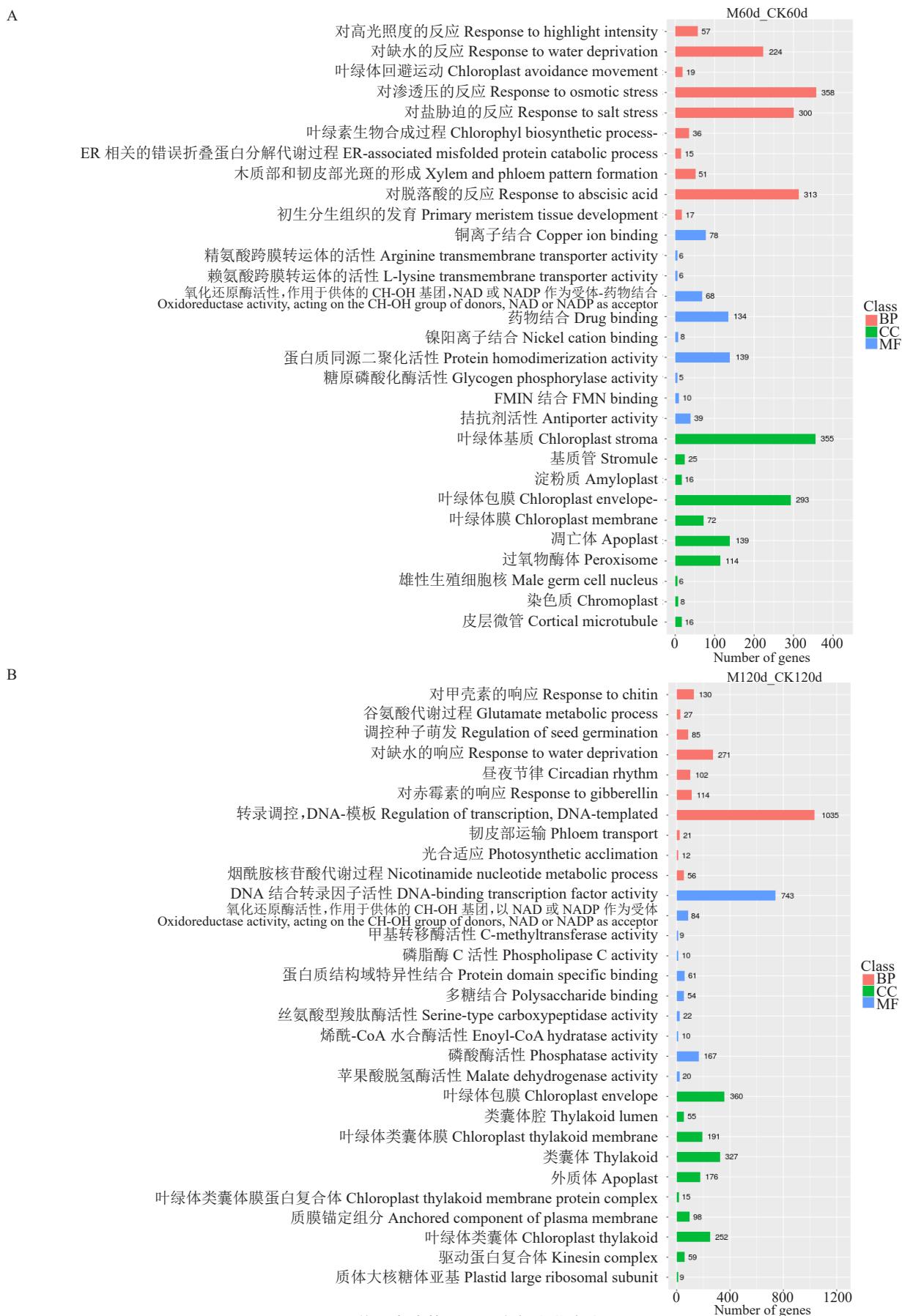


图5 差异表达基因GO注释分类统计

Fig. 5 GO annotation classification of DEGs in endosperm

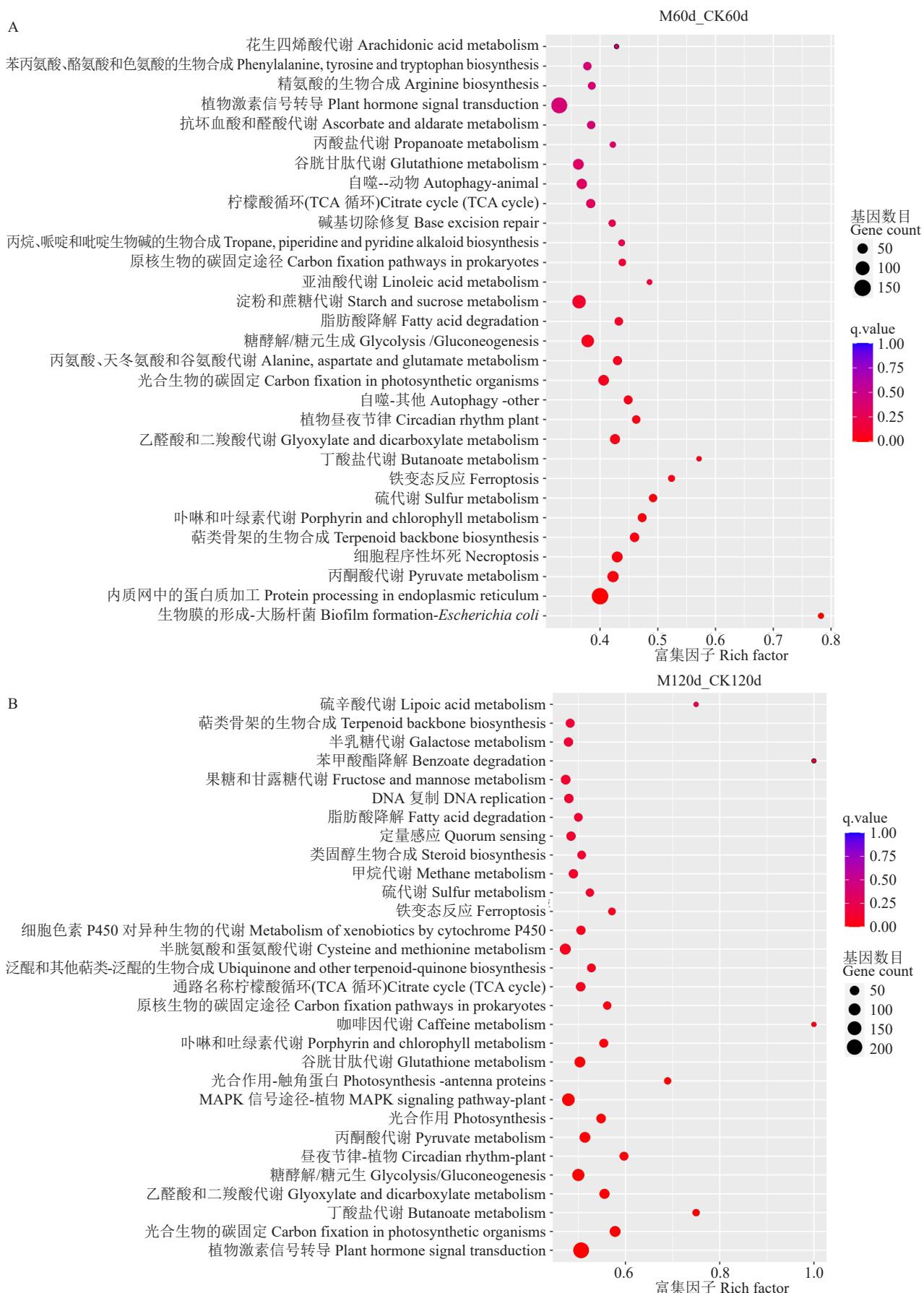
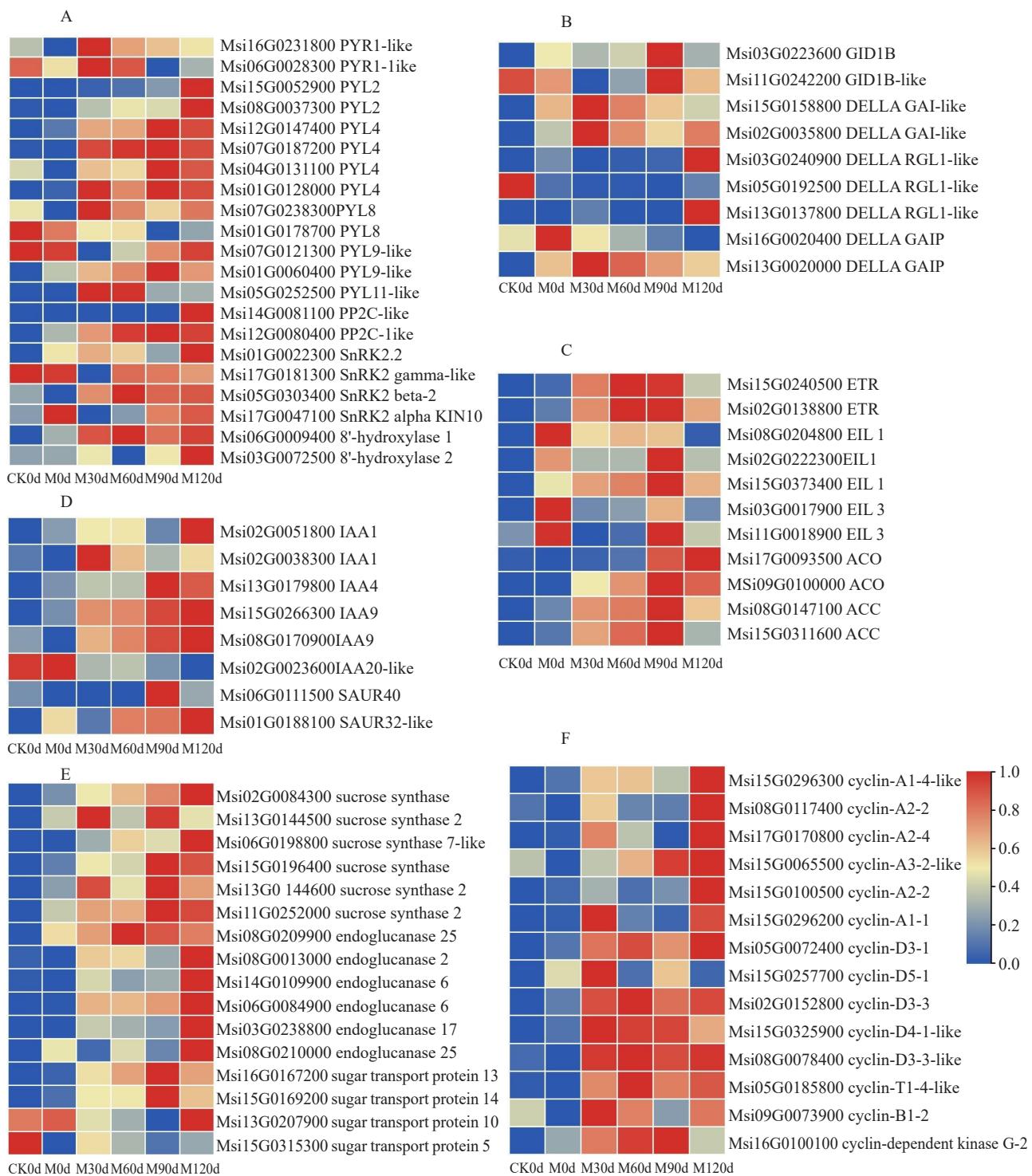


图 6 差异表达基因 KEGG 通路富集散点图

Fig. 6 Scatter plot of KEGG pathway enrichment of DEGs

导和代谢通路上富集的差异表达基因,分析新疆野苹果种子不同低温沙藏层积阶段的激素和代谢相关差异基因表达模式(图7),基于已报道的参与植物激素信号转导相关基因,参考苹果全基因组序列,筛

选ABA、GA、ETH、IAA等激素差异表达基因。在贮藏处理下新疆野苹果植物激素相关差异基因均表现为上调基因数多于下调基因数。在新疆野苹果种子低温沙藏层积过程中,ABA受体PYR/PYL有12个



A. ABA; B. GA; C. ETH; D. IAA; E. 蔗糖代谢; F. 细胞发育; 红色表示高表达,蓝色表示低表达。

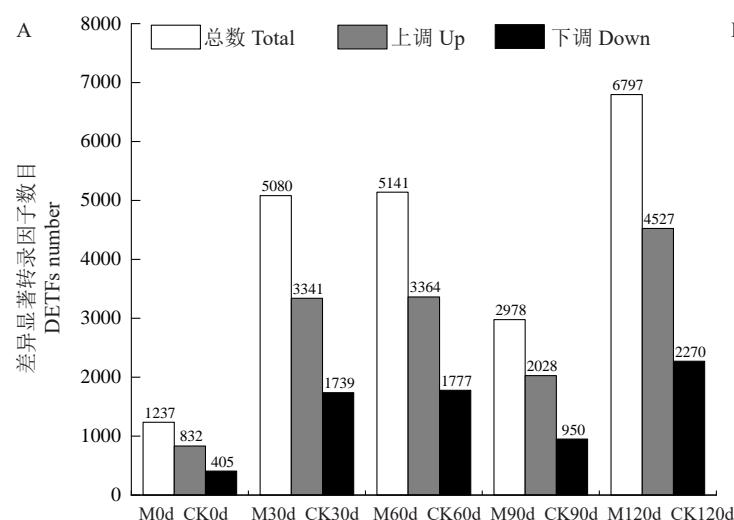
A. Abscisic acid; B. Gibberellin; C. Ethylene; D. Auxin; E. Sucrose metabolism; F. Cell development; red indicates high expression, blue indicates low expression.

图7 植物激素信号转导和代谢差异基因表达热图

Fig. 7 Heatmap of plant hormone signal transduction and metabolic DEGs

基因上调和3个基因下调表达,ABA信号转导因子PP2C和正调控因子GA受体GID1基因呈上调表达趋势,SnRK2有3个基因上调和1个基因下调表达,ABA分解代谢8'-羟化酶2个基因呈上调表达。GA信号转导起负调控作用的生长抑制因子DELLA蛋白有6个基因上调和1个基因下调表达,表明低温沙藏层积处理增强GA信号转导。ETH、IAA在新疆野苹果种子不同层积阶段中呈现出显著差异表达,ETH受体ETR、正调控信号因子EIL(ETHYLENE INSENSITIVE 3/EIN3-LIKE)、ETH的直接前体ACC和ACC氧化酶(ACO)呈上调表达;IAA相关基因5个上调和1个下调表达,生长素上调小RNA(small auxin up-regulated, SAUR)上调表达,表明低温沙藏层积促进IAA的合成。

细胞发育生理变化在种子休眠到休眠解除过程中发挥作用,筛选发现许多DEGs参与细胞分裂和生长发育。细胞周期蛋白A(cyclin-A)和细胞周期蛋白D(cyclin-D)调控细胞有丝分裂活动,细胞周期蛋白基因上调表达,满足种子休眠解除的营养生长需求。另外,筛选到与蔗糖代谢有关的基因,蔗糖分解基因(sucrose synthase, SUS)和内切葡聚糖酶(endoglucanase, EG)在低温沙藏层积过程中上调表达;蔗糖转化酶13、14和1(sugar transport protein, STP)上调表达,而STP5下调表达,这说明蔗糖代谢提供种子发育所需的能量。



A. 显著差异基因表达转录因子统计,横坐标是不同的组合;B. 转录因子与 DEGs 间相关系数图,红色为正相关,白色为不相关,蓝色为负相关。

A. Statistic of significantly differentially expressed transcription factors, horizontal coordinates are different combinations; B. plot of correlation coefficients between TFs and DEGs, red is positive correlation, white is no correlation, and blue is negative correlation.

2.6 转录因子分析

M0d_CK0d、M30d_CK30d、M60d_CK60d、M90d_CK90d、M120d_CK120d 五个比较组中差异显著 TFs 分别为 1237、5080、5141、2978 和 6797 个(图 8-A)。在 M0d_CK0d 中,832 个 TFs 上调和 405 个 TFs 下调;在 M30d_CK30d 中,3341 个 TFs 上调和 1739 个 TFs 下调;在 M60d_CK60d 中,3364 个 TFs 上调和 1777 个 TFs 下调;在 M90d_CK90d 中,2028 个 TFs 上调和 950 个 TFs 下调;在 M120d_CK120d 中,4527 个 TFs 上调和 2270 个 TFs 下调。

采用皮尔逊相关系数分析 8 个 TFs 和 9 个 DEGs 间的相关性(图 8-B),bHLH144 与 ETR、DELLA、PP2C 和 PYR1 呈显著正相关($p < 0.01$);WRKY33、MYB86 与 SAUR32、IAA1 和 SnRK2.2 呈显著正相关($p < 0.01$);bHLH66 与 IAA1、SnRK2.2 呈显著正相关($p < 0.01$),MYB 家族 NACK1 与 IAA1、SnRK2.2 和 DELLA 呈显著正相关($p < 0.01$);MYB1R1 与 ETR 和 GID1B 呈显著负相关($p < 0.01$),WRKY22 与 ETR、PP2C 和 PYR1 呈负相关($p < 0.05$),AP2/ERF 与 PP2C 呈显著负相关($p < 0.01$),与 ETR、DELLA 和 SnRK2.2 呈负相关($p < 0.05$)。

2.7 新疆野苹果种子休眠和激素差异基因的 qRT-PCR 验证

为验证转录组数据结果,挑选 9 个与种子休眠和激素相关的 DEGs 进行 qRT-PCR 实验(图 9),测定

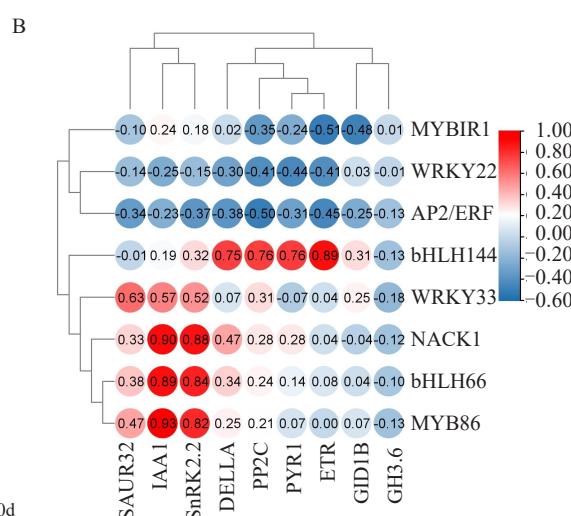


图 8 差异转录因子统计和与 DEGs 间相关性分析

Fig. 8 Differentially transcription factor statistics and correlation analysis with DEGs

其在种子低温层积期间的表达模式,结果显示所选的9个DEGs的qRT-PCR表达模式大多与转录组测

序结果基本一致。结合生物学重复的要求,说明转录组数据可靠。

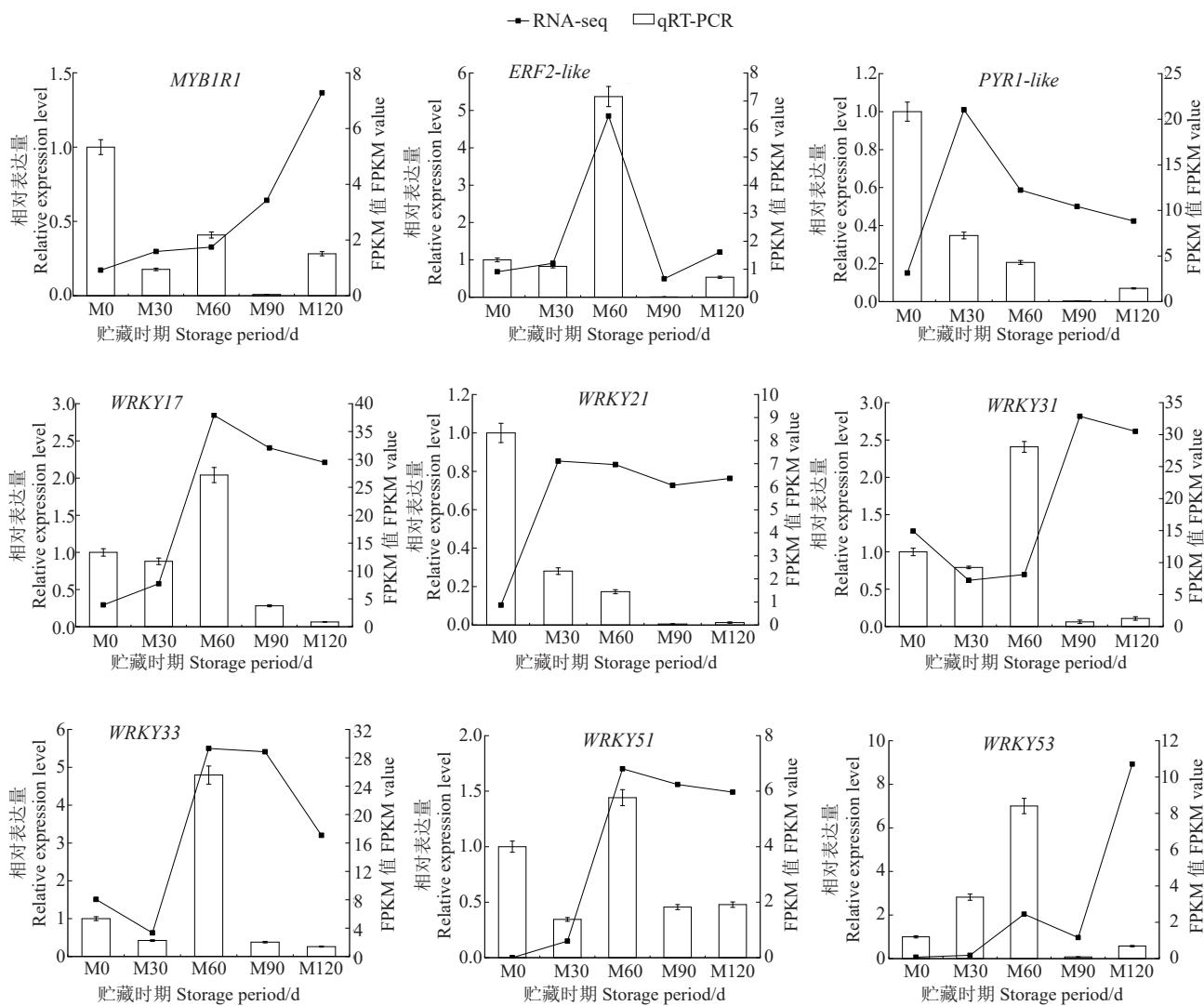


图9 低温沙藏层积期间9个差异表达基因的实时荧光定量验证

Fig. 9 qRT-PCR validation of nine DEGs during low-temperature sand storage stratification

3 讨论

转录组技术是分析种子休眠和萌发相关问题的常用方法之一。笔者在本研究中采用 Illumina 平台对新疆野苹果种子未层积和低温沙藏层积过程样品进行转录组测序,总共获得 209.45 G 的高质量数据,与金冠苹果的参考基因组进行比对,比对效率为 85.09%~94.06%。陈静等^[13]利用 RNA-seq 技术对花生种子休眠和萌发四个时期的样本进行转录组测序,四个时期共表达 1206 个差异 unigenes。发现 ABA 8'-hydroxylases、GA20ox、ACO、*EREBP-like* 和热激蛋白等调控花生种子休眠解除及萌发,植物激

素(GA、ABA、ETH、IAA)相关 unigenes 在花生种子休眠解除过程中呈显著差异。独行菜(*Lepidium apetalum*)低温萌发停滞前后的种子,经 Illumina Hiseq™ 2000 高通量测序平台转录组测序,获得 2108 个差异基因,主要富集在转录调控和植物激素信号转导等相关过程中^[26]。鲁强^[27]基于比较转录组学研究 15 °C 暖温层积处理三桠苦(*Melicope pteleifolia*)种子休眠解除的分子机制,主要与植物激素信号传导通路中 ABA 受体、GA 受体、PP2C 和 DELLA 蛋白等差异基因的显著变化相关。

笔者在本研究中对未层积和低温沙藏层积处理新疆野苹果种子样品进行对比,筛选出 85 个显著

DEGs 调控种子萌发, 114 个 GA 相关的显著 DEGs, 313 个 ABA 相关的显著 DEGs 和 156 个 ETH 相关的显著 DEGs。生物过程主要参与转录调控, 分子功能主要与 DNA 结合转录因子活性、磷酸酶活性和蛋白质同源二聚体活化有关。龙佳丽等^[28]研究低温处理前后甜菜 DEGs 功能富集, 发现激素信号 IAA 和 ABA 信号通路与低温胁迫密切相关。何鑫鑫等^[29]使用 RNA-Seq 测序, 分析了 *Wus2* 和 *IPT* 转基因 AC (Ailsa Craig) 番茄类愈伤组织与普通下胚轴之间的基因表达差异, 在激素信号转导通路中富集到 60 个差异表达基因, 其中上调表达基因 34 个, 下调表达基因 26 个。KEGG 通路富集分析显示, 新疆野苹果种子在不同时期低温沙藏层积过程中, 主要富集的通路有植物激素信号转导、MAPK 信号通路-植物、内质网中的蛋白加工、淀粉和蔗糖代谢、糖酵解/糖原生成等。表明以上途径在新疆野苹果种子低温沙藏层积过程中起积极作用。笔者在本研究中发现, 细胞周期蛋白基因、蔗糖分解基因和内切葡萄糖酶在低温沙藏层积过程中上调表达, 促使种胚代谢活动增加, 将贮藏物质转化为种子萌发营养物质。

植物激素在种子休眠和萌发过程中, 调节激素含量和信号转导的平衡。在静息状态下 ABA 受体 PYR/PYLs/RCARs 以二聚体形式存在, 与 ABA 结合时以单体形式与 PP2Cs 结合, 通过抑制 PP2Cs, 解除 PP2Cs 对蛋白激酶 SnRK2s 的抑制, 从而产生转录因子 ABI5 和 RAV1 被磷酸化, 以激活下游 ABA 响应基因^[30]。ABA 信号传导通路中 PYR/PYL 有 3 个基因下调表达, 2 个 PP2C、3 个 SnRK2 和 2 个 ABA 分解代谢 8'-hydroxylases 基因表达显著上调。相关研究表明, 种子特异性磷酸酶 PP2C 控制在种子发育过程中起作用的高活性 ABA 信号通路^[31]。在水稻低温处理后, 受体 PYR/PYL 蛋白有 1 个基因显著下调, PP2C 有 5 个差异基因显著上调, SnRK2 有 2 个差异表达基因显著上调^[32]。以上说明新疆野苹果 ABA 信号通路基因表达情况与水稻的结果相似。GA 信号转导中 GA 受体 GID 与负调控因子 DELLA 蛋白上调表达, 在 GA 含量低时, DELLA 蛋白会结合下游调控因子来抑制 GA 信号转导; 而 GA 含量高时, DELLA 蛋白与受体 GID1 感知结合, 可促进 GID1/GA/DELLA 复合体的形成, 解除 DELLA 对下游调控因子的抑制, 调控植物内激素变化^[33], 说明低温沙藏层积能促进 GA 合成。IAA 相关基因 5 个上

调表达, SAUR 上调表达。ETH 受体 ETR、ETHYLENE INSENSITIVE 3、ACC 氧化酶上调表达。这与新疆野苹果种子低温沙藏层积过程中 ABA 含量下降、IAA 和 GA 含量增加结果一致^[12], 低温沙藏层积促进了 ACC 氧化酶和 ACC 合成酶的合成。笔者在本研究中进一步证实植物激素信号转导途径在新疆野苹果种子低温沙藏层积中起到重要的调控作用, 探究植物激素相关基因的表达, 还需进一步研究新疆野苹果种子休眠解除的分子机制。

转录因子的主要作用是激活或阻遏基因的转录调控, 其在植物发育、植物激素调节和逆境信号转导等过程中发挥作用^[34]。笔者在本研究中发现 bHLH144 与 ETR、DELLA、PP2C 和 PYR1 呈显著正相关 ($p < 0.01$) ; WRKY33、MYB86 与 SAUR32、IAA1 和 SnRK2.2 呈显著正相关 ($p < 0.01$) ; bHLH66 与 IAA1、SnRK2.2 呈显著正相关 ($p < 0.01$), 表明 bHLH、WRKY 和 MYB 等转录因子可能作为正调节因子参与激素相关基因的转录调控, 在植物生长发育等过程中发挥作用。

4 结 论

综合分析了未层积和低温沙藏层积处理新疆野苹果种子的转录组测序结果, 挖掘新疆野苹果种子休眠解除的相关基因, 筛选出 85 个 DEGs 调控种子萌发、114 个 GA 相关 DEGs、313 个 ABA 相关 DEGs 和 156 个 ETH 相关 DEGs。*ERF2-like* 表达量与 *ACO*、*ACS* 活性变化呈相反趋势、*PYR1-like*、*WRKY33* 基因表达量与 ABA 含量变化均下降, 说明以上基因可能参与 ABA 信号通路调控新疆野苹果种子休眠解除过程。

参考文献 References:

- [1] 阎国荣, 许正. 中国新疆野生果树研究[M]. 北京: 中国林业出版社, 2010: 108-109.
YAN Guorong, XU Zheng. Study on the wild fruit trees in Xinjiang, China[M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 2010: 108-109.
- [2] 于立洋, 李政, 韩佩尧, 张静, 汪敏骅, 田晓晓, 张军. 8 个新疆野苹果优良无性系抗寒性比较[J]. 核农学报, 2017, 31(9): 1827-1835.
YU Liyang, LI Zheng, HAN Peiyao, ZHANG Jing, WANG Minhua, TIAN Xiaoxiao, ZHANG Jun. Comparison of cold hardiness of 8 *Malus sieversii* clones[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2017, 31(9): 1827-1835.

- [3] 魏景利,冯涛,张春雨,张艳敏,陈学森. 新疆野苹果种质资源的研究与应用[J]. 落叶果树,2009,41(4):16-18.
WEI Jingli, FENG Tao, ZHANG Chunyu, ZHANG Yanmin, CHEN Xuesen. Research and application of germplasm resources of *Malus sieversii*[J]. Deciduous Fruits, 2009,41(4):16-18.
- [4] 杨磊,廖康,佟乐,许正,刁永强,陈云华,皮里东. 影响新疆野苹果种子萌发相关因素研究初报[J]. 新疆农业科学,2008,45(2):231-235.
YANG Lei, LIAO Kang, TONG Le, XU Zheng, DIAO Yongqiang, CHEN Yunhua, PI Lidong. Primary report on effect of related factor on germination of *Malus sieversii* (Ledeb.) Rome seed[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2008,45(2):231-235.
- [5] 何晨晨,刘俐君,鲁晓燕. 基于转录组测序分析 NaCl 胁迫下新疆野苹果叶和根糖酵解相关基因的表达[J]. 果树学报, 2020,37(7):951-961.
HE Chenchen, LIU Lijun, LU Xiaoyan. Analysis of genes related to glycolysis in the leaves and roots of *Malus sieversii* under NaCl stress based on transcriptome sequencing[J]. Journal of Fruit Science, 2020,37(7):951-961.
- [6] 马红喜,刘俐君,苏永峰,张德恩,袁引燕,鲁晓燕. 基于转录组测序筛选新疆野苹果组培苗应答冻害光合特性相关基因[J]. 果树学报,2022,39(9):1529-1539.
MA Hongxi, LIU Lijun, SU Yongfeng, ZHANG De'en, YUAN Yinyan, LU Xiaoyan. Screening of freezing stress- responsive genes related to photosynthesis in *in vitro* seedlings of *Malus sieversii* via RNA-seq[J]. Journal of Fruit Science, 2022,39(9): 1529-1539.
- [7] 苏永峰,刘俐君,马红喜,袁引燕,张德恩,鲁晓燕. 基于转录组测序筛选新疆野苹果组培苗应答冻害谷胱甘肽代谢相关的基因[J]. 果树学报,2023,40(5):829-840.
SU Yongfeng, LIU Lijun, MA Hongxi, YUAN Yinyan, ZHANG De'en, LU Xiaoyan. Screening of genes related to glutathione metabolism responding to freezing stress in *Malus sieversii* seedlings *in vitro* based on transcriptome sequencing[J]. Journal of Fruit Science, 2023,40(5):829-840.
- [8] FENG S Y, LIU Z, CHEN H L, LI N, YU T, ZHOU R, NIE F L, GUO D, MA X, SONG X M. PHGD: An integrative and user-friendly database for plant hormone- related genes[J]. Imeta, 2024,3(1):e164.
- [9] SAJEEV N, KOORNNEEF M, BENTSINK L. A commitment for life: Decades of unraveling the molecular mechanisms behind seed dormancy and germination[J]. The Plant Cell, 2024, 36(5):1358-1376.
- [10] URBANOVA T, LEUBNER- METZGER G. Gibberellins and seed germination[J]. Annual plant reviews online, 2016,49:253-284.
- [11] LI X Y, CHEN T T, LI Y, WANG Z, CAO H, CHEN F Y, LI Y, SOPPE W J J, LI W L, LIU Y X. ETR1/RDO3 regulates seed dormancy by relieving the inhibitory effect of the ERF12-TPL complex on *DELAY OF GERMINATION* expression[J]. The Plant Cell, 2019,31(4):832-847.
- [12] 马娟,杨巧玲,徐昕洁,苏布哈尼·买买提江,尼杂木丁·吐逊,叶春秀. 新疆野苹果种子低温层积过程中生理生化指标变化趋势[J/OL]. 分子植物育种, 2023: 1-17(2023-05-30). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230529.1534.034.html>.
MA Juan, YANG Qiaoling, XU Xinjie, Subhani Maimaitijiang, Nizhamudin Tusun, YE Chunxiu. Variation trends of physiological and biochemical indices during low temperature stratification of seeds of *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem[J/OL]. Molecular Plant Breeding, 2023: 1-17(2023-05-30). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230529.1534.034.html>.
- [13] 陈静,江玲,王春明,胡晓辉,翟虎渠,万建民. 花生种子休眠解除过程中相关基因的表达分析[J]. 作物学报,2015,41(6):845-860.
CHEN Jing, JIANG Ling, WANG Chunming, HU Xiaohui, ZHAI Huqu, WAN Jianmin. Expression analysis of genes involved in peanut seed dormancy release (*Arachis hypogaea* L.)[J]. Acta Agronomica Sinica, 2015,41(6):845-860.
- [14] 高云鹏. 紫荆种子休眠解除过程中生理生化变化及分子机理研究[D]. 南京:南京林业大学,2020.
GAO Yunpeng. Study on the physiological and biochemical changes and molecular mechanisms in *Cercis chinensis* seeds during dormancy releasing[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2020.
- [15] ZHANG J, QIAN J Y, BIAN Y H, LIU X, WANG C L. Transcriptome and metabolite conjoint analysis reveals the seed dormancy release process in gallberry pear[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022,23(4):2186.
- [16] 王菲菲,张胜忠,胡晓辉,CHU Ye,崔凤高,钟文,赵立波,张天雨,郭进涛,于豪谅,苗华荣,陈静. 比较转录组分析花生种子休眠调控网络[J]. 作物学报,2023,49(9):2446-2461.
WANG Feifei, ZHANG Shengzhong, HU Xiaohui, CHU Ye, CUI Fenggao, ZHONG Wen, ZHAO Libo, ZHANG Tianyu, GUO Jintao, YU Haoliang, MIAO Huarong, CHEN Jing. Comparative transcriptome profiling of dormancy regulatory network in peanut[J]. Acta Agronomica Sinica, 2023, 49(9): 2446-2461.
- [17] BOLGER A M, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. Bioinformatics, 2014, 30(15):2114-2120.
- [18] KIM D, LANGMEAD B, SALZBERG S L. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements[J]. Nature Methods, 2015,12(4):357-360.
- [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] SCHULZE S K, KANWAR R, GÖLZENLEUCHTER M, THERNEAU T M, BEUTLER A S. SERE: Single-parameter quality control and sample comparison for RNA-Seq[J]. BMC Genomics, 2012,13:524.

- [21] ASHBURNER M, BALL C A, BLAKE J A, BOTSTEIN D, BUTLER H, CHERRY J M, DAVIS A P, DOLINSKI K, DWIGHT S S, EPPIG J T, HARRIS M A, HILL D P, ISSEL-TARVER L, KASARSKIS A, LEWIS S, MATESE J C, RICHARDSON J E, RINGWALD M, RUBIN G M, SHERLOCK G. Gene ontology: Tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium[J]. Nature Genetics, 2000, 25(1):25-29.
- [22] KANEHISA M, GOTO S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(1):27-30.
- [23] YU G C, WANG L G, HAN Y Y, HE Q Y. clusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. OMICS, 2012, 16(5):284-287.
- [24] CHEN C J, WU Y, LI J W, WANG X, ZENG Z H, XU J, LIU Y L, FENG J T, CHEN H, HE Y H, XIA R. TBtools-II: A “one for all, all for one” bioinformatics platform for biological big-data mining[J]. Molecular Plant, 2023, 16(11):1733-1742.
- [25] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 (-Delta Delta C(T)) Method[J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.
- [26] 周茜. 独行菜种子转录组及低温萌发表达谱分析[D]. 乌鲁木齐: 新疆师范大学, 2016.
ZHOU Qian. Transcriptome of seed and DGE method research of seed low temperature germination period in *Lepidium apetalum* Willd[D]. Urumqi: Xinjiang Normal University, 2016.
- [27] 鲁强. 三桠苦种子休眠的解除方法和初步机理研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2019.
LU Qiang. Study on the methods and preliminary mechanism of seed dormancy release of *Melicope pteleifolia*[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2019.
- [28] 龙佳丽, 邹奕, 邱植, 吴则东. 转录组测序揭示激素介导的信号通路参与甜菜低温应答[J]. 中国农学通报, 2021, 37(31):5-14.
LONG Jiali, ZOU Yi, PI Zhi, WU Zedong. Transcriptome analysis reveals hormone-mediated signaling pathways involved in low temperature response in sugar beet[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2021, 37(31):5-14.
- [29] 何鑫鑫, 黄家权. *Wus2* 和 *IPT* 转基因番茄类愈伤组织的转录组分析[J]. 中国瓜菜, 2024, 37(6):27-36.
HE Xinxin, HUANG Jiaquan. Transcriptome analysis of transgenic tomato callus tissues from *Wus2* and *IPT*[J]. China Cucurbits and Vegetables, 2024, 37(6):27-36.
- [30] ZHAO Y, JIA K H, TIAN Y T, HAN K J, EL-KASSABY Y A, YANG H, SI H Y, SUN Y H, LI Y. Time-course transcriptomics analysis reveals key responses of *Populus* to salt stress[J]. Industrial Crops and Products, 2023, 194: 116278.
- [31] ANTONI R, GONZALEZ-GUZMAN M, RODRIGUEZ L, RODRIGUES A, PIZZIO G A, RODRIGUEZ P L. Selective inhibition of clade A phosphatases type 2C by PYR/PYL/RCAR abscisic acid receptors[J]. Plant Physiology, 2012, 158(2): 970-980.
- [32] 高红秀, 朱琳, 刘天奇, 张忠臣. 水稻植物激素响应低温胁迫反应的转录组分析[J]. 分子植物育种, 2021, 19(13):4188-4197.
GAO Hongxiu, ZHU Lin, LIU Tianqi, ZHANG Zhongchen. Transcriptomic analysis of plant hormone response to low temperature stress in rice[J]. Molecular Plant Breeding, 2021, 19(13):4188-4197.
- [33] 张珏锋, 李芳, 钟海英, 陈建明. 荊白‘浙农7号’不同生长阶段的叶片转录组学及激素水平分析[J]. 农业生物技术学报, 2024, 32(2):299-310.
ZHANG Juefeng, LI Fang, ZHONG Haiying, CHEN Jianming. Analysis of transcriptomics and hormone levels of Jiaobai ‘Zhenong 7’ in different growth stages[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2024, 32(2):299-310.
- [34] BAKSHI M, OELMÜLLER R. WRKY transcription factors: Jack of many trades in plants[J]. Plant Signaling & Behavior, 2014, 9(2):e27700.