

低温胁迫下枇杷不同发育阶段的花果转录组比较分析

徐红霞¹, 周慧芬², 李晓颖¹, 姜路花³, 陈俊伟^{1,*}

(¹浙江省农业科学院园艺研究所, 杭州 310021; ²浙江省农业技术推广中心, 杭州 310020; ³淳安县农业局果树技术推广站, 浙江淳安 311700)

摘要: 研究比较了枇杷 (*Eriobotrya japonica* Lindl.) 不同发育阶段花果的低温响应机制。以花蕾、完全开放的花和花后 2 周左右的幼果为试验材料, -3 °C 低温处理 12 h, 以未经低温处理样品为对照, 测定生理生化指标并进行转录组测序分析。低温胁迫导致细胞膜破坏, 超氧阴离子产生速率、丙二醛和脯氨酸含量、抗氧化酶活性明显升高。总体上抗低温能力为花蕾 > 花 > 幼果。转录组测序分析共获得 6 987 个差异表达基因 (DEG), 对这些基因进行通路注释分析, 发现大量与低温胁迫相关的代谢途径, 其中碳水化合物代谢中的糖酵解/糖异生、乙醛酸和二羧酸代谢及磷酸肌醇代谢途径, 氨基酸代谢中的色氨酸代谢和酪氨酸代谢途径, 酯类代谢中的甘油磷脂代谢、 α -亚麻酸代谢和甘油酯代谢途径, 次生代谢中的异喹啉生物碱生物合成途径以及能量代谢中的硫代谢途径在 3 个花果发育时期低温与对照的比较组中显著富集, 说明这几个途径都是枇杷花果响应低温胁迫的重要代谢途径。“苯丙烷类生物合成”途径在前两个时期比较组中富集水平较高, 氨基酸代谢相关途径在幼果比较组中富集更多。另外, 从低温处理相关差异表达基因中筛选到了 53 个 AP2-EREBP 基因, 14 个 WRKY 基因和 15 个 NAC 基因, 并对其中 12 个低温响应相关转录因子基因进行了 qRT-PCR 表达分析, 进一步证实了转录组数据的准确性。

关键词: 枇杷; 花; 果实; 发育阶段; 低温; 转录组; 差异基因; 转录因子

中图分类号: S 667.3

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2021) 09-1680-15

Comparative Transcriptome Analysis of Different Developmental Stages of Flowers and Fruits in Loquat Under Low Temperature Stress

XU Hongxia¹, ZHOU Huifen², LI Xiaoying¹, JIANG Luhua³, and CHEN Junwei^{1,*}

(¹Institute of Horticulture, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; ²Zhejiang Agricultural Technology Extension Center, Hangzhou 310020, China; ³Fruit Tree Technology Extension Station of Chun'an Agricultural Bureau, Chun'an, Zhejiang 311700, China)

Abstract: The study compared the low temperature response mechanism of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) flowers and fruits at different developmental stages. Flower buds, fully open flowers and young fruits were used as the experimental materials, treated at -3 °C for 12 h, and samples without low temperature treatment were used as controls. The relevant physiological and biochemical indexes, as well

收稿日期: 2021-05-24; **修回日期:** 2021-08-25

基金项目: 浙江省“三农六方”科技协作计划项目 (2020SNLF025); 国家重点研发计划项目 (2020YFD1000103); 浙江省重点研发计划项目 (2018C02011); 浙江省农业科学院地方科技合作项目 (CA202009)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: chenjunwei@zaas.ac.cn)

as transcriptome were determined both in control and treated samples. Low temperature stress led to the destruction of cell membranes, the generation rate of superoxide anion, the content of malondialdehyde and proline, and the activity of antioxidant enzymes were dramatically increased. In general, the low temperature resistance ability was flower bud > flower > young fruit. Transcriptome sequencing analysis obtained a total of 6 987 differentially expressed genes (DEG). A large number of metabolic pathways related to low temperature stress were found, including glycolysis/gluconeogenesis, glyoxylic acid and dicarboxylic acid metabolism and phosphoinositol metabolism pathways in carbohydrate metabolism, tryptophan metabolism and tyrosine metabolism pathways in amino acid metabolism, glycerol phospholipid metabolism, α -linolenic acid metabolism and glyceride metabolism pathways in ester metabolism, isoquinoline alkaloid biosynthesis pathway in secondary metabolism, as well as thiometabolism pathway in energy metabolism, were significantly enriched in all comparison groups of low temperature and control at three flower and fruit development stages, which indicated that these pathways were important metabolic pathways in response to low temperature stress in loquat. The phenylpropanoid biosynthesis pathway was significantly enriched in both flower bud and flower comparison groups, and more amino acid metabolism pathways were enriched in young fruit comparison group after low temperature treatment. In addition, 53 AP2-EREBP genes, 14 WRKY genes and 15 NAC genes were screened from the differentially expressed genes related to low temperature treatment, and 12 low temperature response-related transcription factor genes were analyzed by qRT-PCR, which further confirmed the accuracy of transcriptome data.

Keywords: *Eriobotrya japonica*; flower; fruit; development stage; low temperature; transcriptome; differentially expressed gene; transcription factor

枇杷花期从 10 月到翌年 2 月, 其花蕾能耐 -6°C 低温, 幼果能耐 -3°C 低温(陈俊伟 等, 2017)。浙江等北亚热带地区冬季低于 -3°C 的低温经常发生, 花果冻害是影响枇杷产业发展的重要因子。枇杷不同发育阶段的花果抗低温能力有显著差异, 例如 2016 年 1 月下旬遭遇 -8°C 左右的低温, 露地栽培的枇杷幼果几乎全部冻死, 而部分正值花期的枇杷未发生冻害。Fujikawa 等(2009)认为植物抗冻能力不仅与基因型有关, 也与组织/器官有关。

近年来, 转录组测序(RNA-Seq)技术的发展为全面量化低温胁迫相关响应基因的表达, 分析其网络调控机制以及挖掘重要功能基因提供了重要手段(Zhang et al., 2019; Lv et al., 2020)。例如, 利用转录组技术在木薯顶芽中发现 508 个早期低温响应相关基因, 并鉴定出一批具有广泛生物功能的胁迫相关基因(An et al., 2012)。对低温处理后的胡杨进行转录组分析, 发现不仅 CBF 同源基因在响应低温胁迫中起关键作用, 而且饱和脂肪酸、ABA 和钙信号成分也是胡杨具有快速灵敏的低温响应机制的重要原因(Chen et al., 2014)。杜文丽等(2021)分析了低温胁迫 0 和 12 h 后的黄瓜叶片的转录组变化, 发现有 916 个基因上调, 369 个基因下调, 筛选出 10 个可能与耐低温相关的候选基因。

本研究中, 选取枇杷花蕾、完全开放的花和花后 2 周左右的幼果进行转录组学研究, 以期了解不同发育阶段花果中相关基因和代谢途径对低温胁迫的响应机制, 为枇杷抗冻基因的挖掘和利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料及处理

供试材料为枇杷 (*Eriobotrya japonica* Lindl.) 红肉新品系 ‘浙红 16’, 2012 年定植于浙江省农业科学院嘉兴市海宁市杨渡基地。2019 年 12 月 2 日分别采集处于花蕾期花穗、盛花期花穗和花后 2 周左右的幼果期果穗枝条, 置于低温光照培养箱 (型号 LI15-2, Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, OR, USA) 中, $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理 12 h; 同期对照置于 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的光照培养箱中 12 h。12 h 后分别采集处理和对照的花蕾、完全开放的花和花后 2 周左右的幼果, 经液氮冷冻后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 备用于转录组和生理指标测定。每组样本 3 个生物学重复。

1.2 RNA 提取及转录组测序

采用多糖多酚 RNA 提取试剂盒提取样本的总 RNA (TIANGEN, 北京), RNA 检测合格后委托百迈克生物科技有限公司进行转录组测序分析。

样品总 RNA 用带有 Oligo (dT) 的磁珠富集 mRNA。加入 Fragmentation buffer 将 mRNA 打断成短片段, 以 mRNA 为模板, 用 Random hexamers (六碱基随机引物) 合成第 1 条 cDNA 链, 然后加入缓冲液、dNTPs、RNase H 和 DNA polymerase I 合成第 2 条 cDNA 链, 经过 QiaQuick PCR 试剂盒纯化并加 EB 缓冲液洗脱之后做末端修复、加 poly (A) 并连接测序接头, 然后采用凝胶电泳选择片段, 最后进行 PCR 扩增。建好的文库用 Illumina HiSeq4000 进行测序。

1.3 基因功能注释及表达量分析

拼接获得基因后, 与 8 个公共数据库 (COG、GO、KEGG、KOG、Pfam、Swissport、eggNOG 和 Nr) 中的蛋白序列进行比对, 取阈值 $e \leq e^{-10}$, 通过序列相似性进行功能注释, 序列相似性比对主要使用 BLAST 算法。使用 RPKM (Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads) 统计已知基因的表达情况, RPKM 越大, 表达水平越高 (Trapnell et al., 2010)。

1.4 差异基因的对比分析

通过 FDR (false discovery rate) 设定阈值的方法来筛选差异基因 (Anders & Huber, 2010)。两组对比中, $|\log_2 \text{fold change}| \geq 2$, $\text{FDR} < 0.5$ 被认为是差异表达。

1.5 实时荧光定量 PCR 分析

根据转录组数据分析结果挑选在不同发育阶段花果中对低温响应变化趋势一致的 12 个转录因子基因进行荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 验证。提取各样品总 RNA 并用全式金普通反转录试剂盒 (AH311-02) 合成 cDNA。参照转录组测序得到的相关基因序列信息, 采用 Premier 5.0 软件设计实时引物 (表 1)。使用 SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa: Code No.RR820A) 实时定量 PCR 试剂盒, 在 Light Cycler 480 II (Roche) 实时定量 PCR 仪进行定量分析。20 μL 反应体系: SYBR Premix Ex Taq II 10 μL , cDNA 模板 2 μL , 上、下游引物各 0.8 μL ($10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), ddH₂O 6.4 μL 。扩增反应程序: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, 循环反应 40 次。然后 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s 作为熔解曲线分析程序。以枇杷 *Ejactin* 作为内参基因, 相对表达量计算采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法。

表 1 荧光定量 PCR 中所用差异表达基因及其引物序列
Table 1 Differentially expressed genes and their primer sequences in qRT-PCR

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	引物序列 (5' - 3') Primer sequence	
<i>Ejactin</i>	c158550.graph_c1	F: GGATTGCTGGTGATGATGC;	R: CCGTGCTCAATGGGATACTT
<i>ERF37</i>	c106174.graph_c0	F: GCTGGGTGAGGAGATAACGG	R: AAGATGCGAAGACGGTGGTG
<i>ERF73</i>	c123742.graph_c0	F: GCTTTCCTGAGGCGGACGAT	R: AATTGAGCTTGGAGGCGATT
<i>ERF35</i>	c125424.graph_c0	F: GGGGAGAGCATAGCGATACA	R: GCTTACGTCATTTCTGGGC
<i>ERF105</i>	c126492.graph_c0	F: TCGCTCGTACTTGTACACC	R: GCTGACCATCAAAGGCAACT
<i>RAV2</i>	c126935.graph_c1	F: GAGGATGATCGGCTGGGAGT	R: AGCTGCTGCAAGGCACTACA
<i>ERF60</i>	c129543.graph_c0	F: TGGCCAATAAGAATCACCAA	R: CCAAAAAGGATCTGACGAGG
<i>ERF33</i>	c46214.graph_c0	F: GCCTGTTCTTTGATTTTGGT	R: TCATGAGCTGATCTTCCCTC
<i>WRKY33</i>	c142932.graph_c0	F: CCACTGAAAACCAATCGTAC	R: CTTAGACTTCTTATCGCAAC
<i>NAC72</i>	c51471.graph_c0	F: ATGTTGGGGTTGGATAAGAA	R: CGGAATAGAAGAAGCAGAAGAG
<i>NAC74</i>	c136256.graph_c0	F: AGTCCATAGTATGCGCCACC	R: TGACTGCGGTTTCTTTTGA
<i>NAC29</i>	c130635.graph_c0	F: GAAACGGGAACATTGGTAGT	R: AATGAATGAGATGCTGGTGT
<i>NAC91</i>	c136368.graph_c0	F: ATCATCGCTAAATTCATTCC	R: ACTTTACCACCTCTACCAAC

1.6 生理指标测定

丙二醛 (MDA) 含量测定参照 Dhindsa 等 (1981) 的方法, 超氧阴离子产生速率测定参照 Elstner 和 Heupel (1976) 的方法, 脯氨酸含量测定采用磺基水杨酸茚三酮法 (Bates et al., 1973)。

超氧化物歧化酶 (SOD) 活性测参考 Beauchamp 和 Fridovich (1981) 的方法, 将在 560 nm 波长下, 使 NBT 光还原速率抑制 50%所需要的酶活力定义为 1 个酶活力单位。抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 活性测定参考 Nakano 和 Asada (1981) 的方法, 将在 290 nm 波长下吸光度每分钟减少 0.01 为 1 个酶活力单位。过氧化氢酶 (CAT) 活性测定按照 Cheng 和 Song (2008) 的方法, 将在 240 nm 波长下吸光度每分钟减少 0.01 为 1 个酶活力单位。蛋白质含量按考马斯亮蓝染料结合法 (Bradford, 1976) 测定。

1.7 数据统计分析

采用 IBM SPSS Statistics 20 进行数据分析, 运用单因素方差分析 (ANOVA) 的方法, 以 Duncan's 多重极差法进行各处理的平均值检验, 最小显著性差异法 (LSD) 分析不同处理间的差异显著性 ($P \leq 0.05$), 采用 EXCEL 统计数据并制图。

2 结果与分析

2.1 低温响应相关的生理生化指标变化

从图 1 可以看出, ‘浙红 16’ 枇杷的花蕾、花和幼果经低温处理后, 超氧阴离子产生速率分别为对照的 1.72 倍、2.12 倍和 2.45 倍, 说明低温处理导致细胞产生大量自由基; MDA 含量比对照增加 21.7%、28.8%和 81.1%; 脯氨酸 (Pro) 含量上升 23.2%、30.6%和 24.6%。低温处理后抗氧化物酶 SOD、APX 和 CAT 活性也显著升高, 其中 SOD 活性分别比对照组增加了 35.1%、28.2%和 34.2%, APX 活性增加了 30.8%、41.2%和 37.2%, CAT 活性增加了 110.1%、104.5%和 23.8%。从图 1 还可以看出, 低温处理后幼果中的超氧阴离子产生速率以及 MDA 含量的上升幅度都显著高于花蕾和花, 说明幼果的细胞膜受破坏程度最为严重; 花蕾 MDA 含量和超氧阴离子产生速率上升幅度最小, 脯氨酸含量最高, 表明花蕾的抗低温能力相对较高, 花其次, 幼果最低。

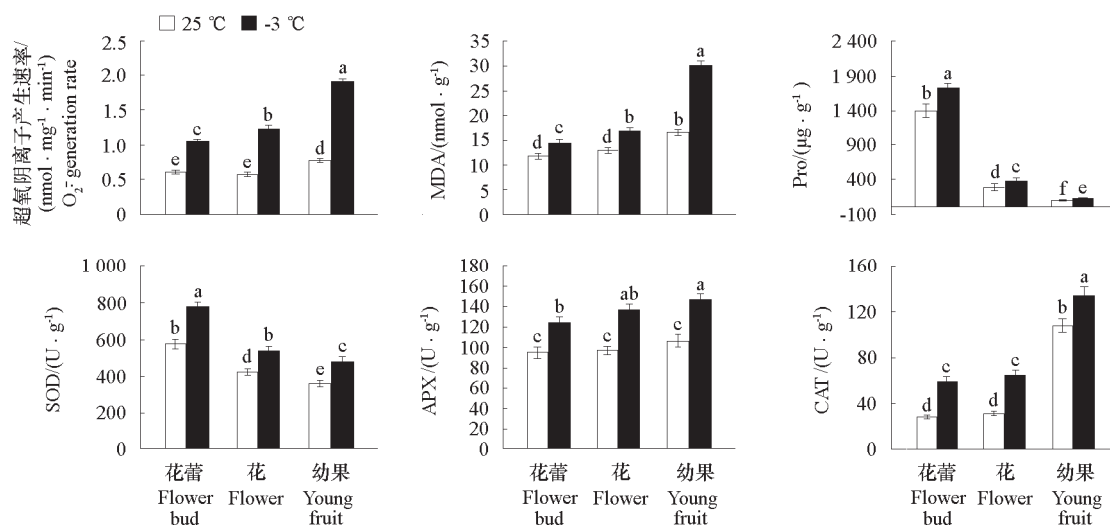


图1 枇杷不同阶段花果低温处理后超氧阴离子产生速率, MDA 和脯氨酸含量, SOD、APX 和 CAT 活性的变化

不同字母表示差异显著 ($P \leq 0.05$)。

Fig. 1 Changes in superoxide anion generation rate, MDA content, proline content, SOD activity, APX activity, and CAT activity in response to low temperature stress in different developmental stages of flowers and young fruits

* Different letters are significantly different at $P \leq 0.05$.

2.2 测序数据整体评估及基因的功能注释

完成 3 个发育阶段低温处理和对照 (各 3 次生物学重复) 共 18 个样品的转录组测序, 共获得 Clean Data153.08 Gb, 各样品均达到 6.71 Gb, Q30 碱基百分比在 91.83%及以上。组装后共获得 52 979 个 Unigene, 其中长度在 1 kb 以上的有 20 720 个。对组装获得的 Unigene 进行功能注释, 包括与 Nr、Swiss-Prot、KEGG、KOG、eggNOG、GO 和 Pfam 数据库的比对, 共获得 38 950 个 Unigene 的注释结果, 其中有 97.80% 能够在 Nr 数据库中被注释到, 而在 KEGG 数据库被注释到的基因最少, 只有 38.03%(表 2)。

表 2 基因功能注释结果统计

Table 2 The statistical result of unigene functional annotation

数据库 Database	注释数量 Number of annotated unigene	比例/% Percentage of annotated unigene
Nr	38 093	97.80
Swiss-Prot	22 119	56.79
KEGG	14 813	38.03
eggNOG	35 024	89.92
KOG	20 989	53.89
GO	25 436	65.30
Pfam	27 156	69.72

2.3 差异表达基因的 GO 分类

在 52 979 个 Unigene 中有 6 987 个为差异表达基因 (DEG), 其中有 873 个是 3 个发育阶段花果共有的低温响应基因, 花蕾特有的低温响应基因有 746 个, 花特有的低温响应基因有 1 256 个, 幼果特有的低温响应基因有 2 682 个, 说明参与低温响应的基因数量幼果中较多。

将筛选出来的不同发育阶段差异基因进行 GO 分析发现, 一共有 3 831 个差异基因能够得到注释, 按 GO 功能分类, 可分为生物学过程、细胞组分和分子功能三大类 (表 3)。3 个发育阶段的低温处理与各自对照的比较组中差异基因数量不同, 但是富集到的主要词条大致相同。在生物学过程分类下, 前 3 个词条为“代谢过程”“细胞过程”和“单一生物过程”, 胁迫相关的“应激反应”“生物调控”和“信号”等也有较高富集; 在细胞组分分类下, 前 3 个词条分别为“细胞”“细胞部分”和“细胞器”, 其次是“膜”和“膜部分”; 在分子功能分类下, 前 3 个词条分别为“催化活性”“联

结”和“转运活动”，胁迫相关的“抗氧化活性”也得到显著富集。说明这些富集途径对枇杷响应低温胁迫具有十分重要的作用。

表 3 枇杷 3 个发育阶段花果低温处理与对照比较组中差异表达基因在 GO 各分类中的数量
Table 3 The number of DEGs in GO classification in low-temperature treatment and control comparison groups of three developmental stages of flowers and young fruits in loquat

GO 分类 GO classification	GO 序列号 GO accession	注释功能（词条） Term	差异基因数 DEGs number	- 3 °C vs 25 °C		
				花蕾 Flower bud	花 Flower	幼果 Young fruit
生物学过程 Biological process	GO:0008152	代谢过程 Metabolic process	2 193	298	781	1 239
	GO:0009987	细胞过程 Cellular process	2 127	248	661	1 075
	GO:0044699	单一生物过程 Single-organism process	1 863	230	585	1 033
	GO:0051179	定位 Localization	790	108	276	546
	GO:0065007	生物调控 Biological regulation	616	142	270	427
	GO:0071840	细胞组分或生物合成 Cellular component organization or biogenesis	465	40	132	293
	GO:0050896	应激反应 Response to stimulus	457	94	193	279
	GO:0023052	信号 Signaling	122	24	47	77
	GO:0051704	多生物过程 Multi-organism process	114	11	39	73
	GO:0032502	发育过程 Developmental process	94	25	35	46
	GO:0040007	生长 Growth	75	2	16	41
	GO:0022414	生殖过程 Reproductive process	59	15	25	44
	GO:0000003	再生 Reproduction	55	0	26	46
	GO:0032501	多细胞生物过程 Multicellular organismal process	48	17	22	17
	GO:0022610	生物粘附 Biological adhesion	17	0	3	6
	GO:0002376	免疫系统过程 Immune system process	7	0	2	0
	GO:0048511	节律过程 Rhythmic process	3	0	1	1
细胞组分 Cellular component	GO:0005623	细胞 Cell	1 808	283	718	1 229
	GO:0044464	细胞部分 Cell part	1 796	280	710	1 222
	GO:0043226	细胞器 Organelle	1 260	201	485	858
	GO:0016020	膜 Membrane	1 642	294	623	1 024
	GO:0044425	膜部分 Membrane part	1 293	234	495	805
	GO:0044422	细胞器部分 Organelle part	621	67	218	418
	GO:0032991	大分子复合物 Macromolecular complex	552	42	208	361
	GO:0031974	膜封闭的管腔 Membrane-enclosed lumen	160	11	40	112
	GO:0005576	细胞外区域 Extracellular region	87	18	45	61
	GO:0030054	细胞连接 Cell junction	15	4	6	5
	GO:0055044	共质体 Symplast	14	4	5	5
	GO:0019012	病毒 Virion	4	0	1	4
	GO:0044423	病毒部分 Virion part	4	0	1	4
	GO:0009295	内核 Nucleoid	11	0	5	6
	GO:0044421	细胞外区域 Extracellular region part	28	3	21	26
分子功能 Molecular function	GO:0003824	催化活性 Catalytic activity	1 949	308	725	1 222
	GO:0005488	联结 Binding	1 670	321	688	1 024
	GO:0005215	转运活动 Transporter activity	402	53	144	277
	GO:0005198	结构分子活动 Structural molecule activity	178	9	102	85
	GO:0001071	核酸联结转录因子活性 Nucleic acid binding transcription factor activity	109	40	64	68
	GO:0016209	抗氧化活性 Antioxidant activity	40	10	21	21
	GO:0009055	电子载体活动 Electron carrier activity	35	5	13	20
	GO:0060089	分子传感器活动 Molecular transducer activity	36	5	7	8
	GO:0004871	信号传导活动 Signal transducer activity	36	10	18	23
	GO:0000988	转录因子活性，蛋白质结合 Transcription factor activity, protein binding	16	4	3	12
	GO:0045735	营养库活性 Nutrient reservoir activity	5	1	3	2
	GO:0031386	蛋白质标签 Protein tag	5	0	0	2
	GO:0016530	金属伴侣活性 Metallochaperone activity	1	1	1	1
	GO:0045182	翻译调控活性 Translation regulator activity	2	0	0	2

2.4 差异表达基因的 COG 分类

将筛选出来的差异基因分别进行 COG 分析（表 4），结果显示，在 3 个发育阶段（花蕾、花、幼果）低温处理与各自对照的比较组中，富集到的第 1 位词条均为“碳水化合物转运与代谢”，第 2 位词条均为“一般功能预测”，花蕾阶段的第 3~5 位富集词条分别为“信号转导机制”“脂质转运与代谢”和“翻译后修饰，蛋白质折叠，分子伴侣”；花阶段分别为“翻译，核糖体结构与生物合成”“脂质转运与代谢”和“能量产生与转换”；幼果阶段分别为“氨基酸转运与代谢”“脂质转运与代谢”和“翻译，核糖体结构与生物合成”。以上结果说明“碳水化合物转运与代谢”和“脂质转运与代谢”在不同发育阶段的花果响应低温胁迫过程中都有着重要的作用，而花蕾、花和幼果响应机制又存在差异。

表 4 枇杷 3 个发育阶段花果低温处理与对照比较组中差异表达基因在 COG 各分类中的数量
Table 4 The number of DEGs in COG classification in low-temperature treatment and control comparison groups of three developmental stages of flowers and young fruits in loquat

COG 分类 COG classification	分类名称 Classification name	- 3 ℃ vs 25 ℃		
		花蕾 Flower bud	花 Flower	幼果 Young fruit
A	RNA 加工和修饰 RNA processing and modification	0	0	1
B	染色质结构与动态 Chromatin structure and dynamics	0	0	1
C	能量产生与转换 Energy production and conversion	41	81	132
D	细胞周期控制，细胞分裂，染色体分割 Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	7	7	13
E	氨基酸转运与代谢 Amino acid transport and metabolism	27	72	184
F	核苷酸转运与代谢 Nucleotide transport and metabolism	7	19	56
G	碳水化合物转运与代谢 Carbohydrate transport and metabolism	120	150	274
H	辅酶转运与代谢 Coenzyme transport and metabolism	26	36	73
I	脂质转运与代谢 Lipid transport and metabolism	66	82	156
J	翻译，核糖体结构与生物合成 Translation, ribosomal structure and biogenesis	33	89	156
K	转录 Transcription	26	25	33
L	复制，重组与修复 Replication, recombination and repair	15	16	35
M	细胞壁/膜/包膜生物合成 Cell wall/membrane/envelope biogenesis	36	43	73
N	细胞运动 Cell motility	2	1	4
O	翻译后修饰，蛋白质折叠，分子伴侣 Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	59	71	141
P	无机离子转运与代谢 Inorganic ion transport and metabolism	46	80	122
Q	次生代谢物生物合成，转运与代谢 Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	42	69	123
R	一般功能预测 General function prediction only	85	126	261
S	功能未知 Function unknown	29	40	48
T	信号转导机制 Signal transduction mechanisms	67	70	101
U	细胞内运输，分泌和囊泡运输 Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	0	1	8
V	防御机制 Defense mechanisms	10	22	47
W	细胞外结构 Extracellular structures	0	0	1
X	移动元件：原噬菌体，转座子 Mobilome: prophages, transposons	7	9	7
Y	细胞核结构 Nuclear structure	0	0	0
Z	细胞骨架 Cytoskeleton	2	3	2

2.5 差异表达基因的 KEGG 分析

图 2、图 3、图 4 显示的是 3 个发育阶段（花蕾、花、幼果）低温处理与各自对照的比较组中差异表达基因在 KEGG 分类中显著相关代谢通路。其中花蕾阶段富集到 17 条通路（图 2），花阶段富集到 22 条通路（图 3），而幼果阶段富集到 36 条通路（图 4）。3 个比较组中都显著富集的途径有糖酵解/糖异生、色氨酸代谢、乙醛酸和二羧酸代谢、甘油磷脂代谢、异喹啉生物碱生物合成、

酪氨酸代谢、 α -亚麻酸代谢、甘油酯代谢、磷酸肌醇代谢和硫代谢等途径, 说明这些途径都参与到低温胁迫响应过程中, 是枇杷花果抵御低温胁迫的重要代谢途径。另外, 花蕾阶段“苯丙烷类生物合成”途径富集水平较高且差异基因数量最多, 花阶段“丙酮酸代谢”和“苯丙烷类生物合成”途径相关差异表达基因较多; 而幼果阶段富集到的通路数量和差异基因数量都明显多于花蕾和花, 另外, “丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢”“氨基糖和核苷酸糖代谢”以及“ β -丙氨酸代谢”等途径中富集到的差异基因数量较多。

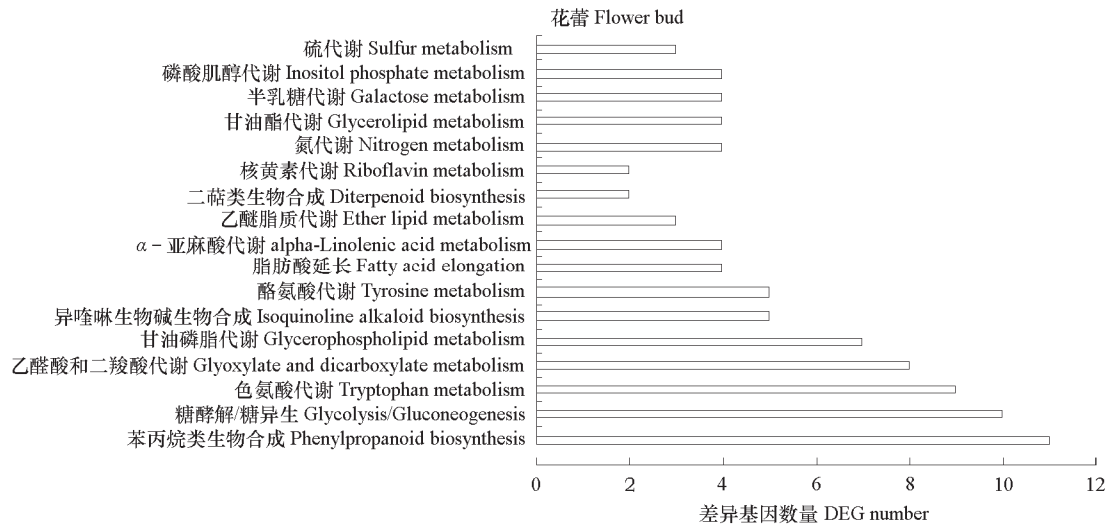


图 2 枇杷花蕾低温处理与对照比较差异基因代谢通路富集图

Fig. 4 Pathway assignment based on Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) in low-temperature treatment and control comparison group of flower bud in loquat

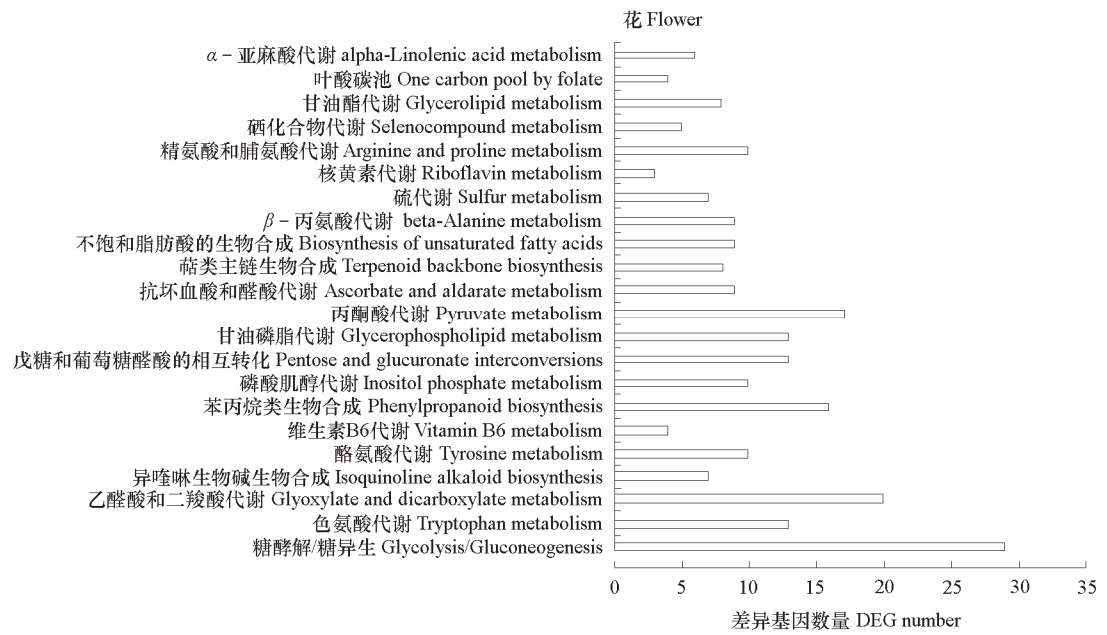


图 3 枇杷花低温处理与对照比较差异基因代谢通路富集图

Fig. 3 Pathway assignment based on Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) in low-temperature treatment and control comparison group of flower in loquat

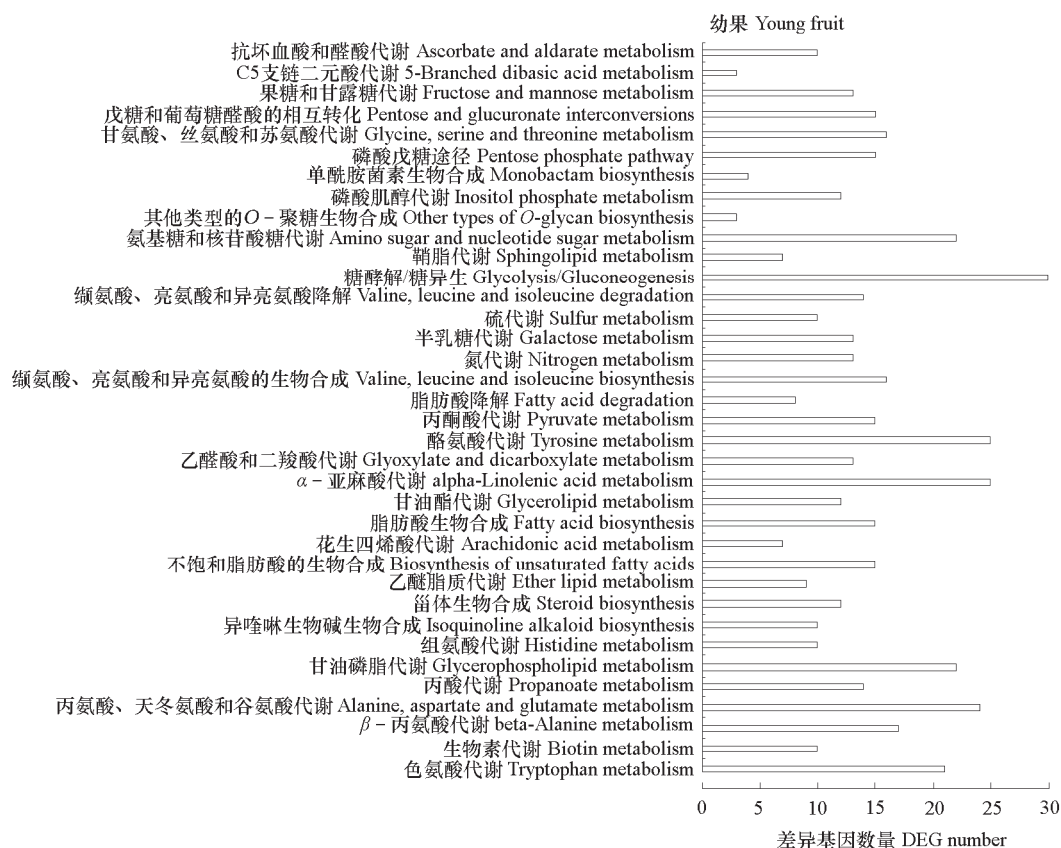


图4 枇杷幼果低温处理与对照比较差异基因代谢通路富集图

Fig. 4 Pathway assignment based on Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) in low-temperature treatment and control comparison group of young fruit in loquat

2.6 低温响应相关差异基因的表达分析

如图5所示,在3个比较组中共筛选出8个糖酵解/糖异生途径相关的差异表达基因,包括3个丙酮酸脱羧酶基因(c127682.graph_c0、c128517.graph_c0、c107482.graph_c0),1个乙醛脱氢酶基因(c129326.graph_c0),1个磷酸甘油酸激酶基因(c134491.graph_c0),1个转酮醇酶基因(c139284.graph_c0)和2个果糖二磷酸醛缩酶基因(c141373.graph_c0、c105239.graph_c1),其中丙酮酸脱羧酶和乙醛脱氢酶基因在低温处理后都上调表达,而磷酸甘油酸激酶基因、转酮醇酶基因和果糖二磷酸醛缩酶基因呈下调表达趋势。

甘油磷脂代谢途径相关差异表达基因中1-酰基甘油-3-磷酸O-酰基转移酶基因(c131150.graph_c0)、磷脂酶D(c136966.graph_c0)、磷脂酸胞苷酰转移酶(c132786.graph_c0)、磷脂酰丝氨酸脱羧酶(c110827.graph_c0)、磷酸胆碱胞苷酰转移酶(c102643.graph_c0)、磷脂酶B(c74066.graph_c0)和胆碱/乙醇胺激酶(c129533.graph_c0)在低温处理后均呈上调表达趋势;而甘油-3-磷酸乙酰转移酶(c135569.graph_c0)呈下调趋势。

硫代谢相关的5个基因中硫酸腺苷酰转移酶基因(c135154.graph_c0)在低温处理后上调表达,而3'(2'),5'-二磷酸核苷酸酶基因(c139230.graph_c1)、腺苷酰硫酸激酶基因(c119027.graph_c0)、亚硫酸还原酶基因(c136338.graph_c0)和O-乙酰高丝氨酸/O-乙酰丝氨酸硫基酶基因(c77472.graph_c0)均下调表达。

色氨酸代谢相关的 9 个差异表达基因, 包括 1 个 (NAD⁺) 醛脱氢酶基因 (c129326.graph_c0)、1 个犬尿氨酸酶基因 (c78045.graph_c0)、4 个过氧化氢酶基因 (c129888.graph_c0、c131838.graph_c0、c139869.graph_c0、c110008.graph_c0)、2 个腈水解酶基因 (c118875.graph_c0、c125840.graph_c0) 和 1 个酰胺酶基因 (c97059.graph_c0) 在低温处理后表达丰度均明显上升。

在苯丙烷类生物合成相关途径中, β -葡萄糖苷酶基因 (c78455.graph_c0) 在低温处理后均下调表达, 其他 7 个基因, 包括 4 个肉桂醇脱氢酶基因 (c37413.graph_c0、c38008.graph_c0、c137556.graph_c0、c138415.graph_c1)、1 个过氧化物酶基因 (c77733.graph_c0), 1 个松柏醛脱氢酶基因 (c77461.graph_c0) 和 1 个 4-香豆酸辅酶 A 连接酶基因 (c137355.graph_c0), 均下调表达。

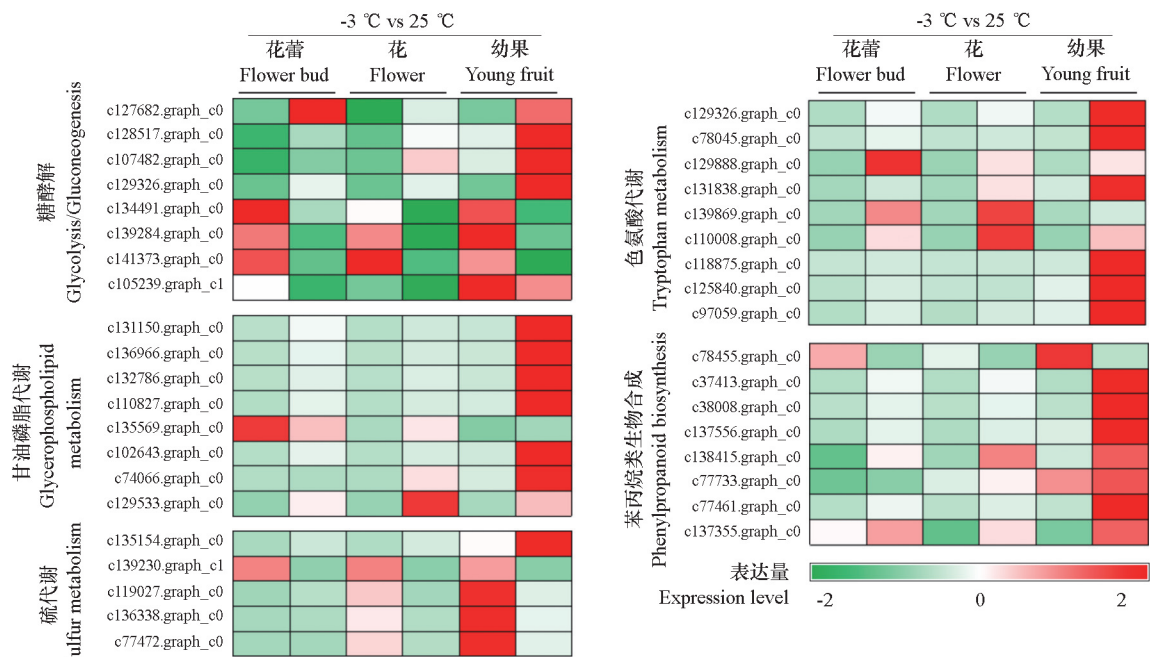


图 5 枇杷低温响应相关差异基因的表达热图

Fig. 5 The heatmap of partial low temperature responding DEG in loquat

2.7 低温响应相关转录因子筛选及 qRT-PCR 验证

本试验获得的转录因子数量最多的 3 个家族为 AP2-EREBP (76)、WRKY (58) 和 NAC (58), 说明这 3 个基因家族在枇杷响应低温和花果发育过程中起重要作用。进一步筛选到与响应低温相关的 AP2-EREBP 基因 53 个, WRKY 基因 14 个和 NAC 基因 15 个, 3 个阶段 3 个基因家族中上调的基因数量均多于下调基因; 并且 WRKY 在花蕾和花阶段低温与对照比较组中没有下调基因 (图 6)。

为验证 RNA-seq 数据的准确性, 进一步分析枇杷花果低温响应机制、筛选低温响应相关转录因子, 在差异表达基因中筛选到 6 个在 3 个比较组中均显著上调表达的 AP2-EREBP 基因 (*ERF37*, c106174.graph_c0; *ERF73*, c123742.graph_c0; *ERF35*, c125424.graph_c0; *ERF105*, c126935.graph_c1; *RAV2*, c129543.graph_c0; *ERF60*, c46214.graph_c0), 1 个均显著下调的 AP2-EREBP 基因 (*ERF33*, c126492.graph_c0), 1 个均显著上调的 WRKY 基因 (*WRKY33*, c142932.graph_c0), 4 个均显著上调表达的 NAC 基因 (*NAC72*, c51471.graph_c0; *NAC29*, c136256.graph_c0; *NAC91*, c136368.graph_c0; *NAC74*, c130635.graph_c0), 利用 qRT-PCR 技术验证其在不同样品中的表达情

况。结果（表 6）显示，在 3 个比较组中，qRT-PCR 结果与 RNA-seq 结果虽然表达倍数略有差异，但基本趋势一致，说明转录组结果具有可靠性。这些基因表达量的上调或下调也预示着它们在枇杷花果抗低温胁迫中可能发挥重要作用。

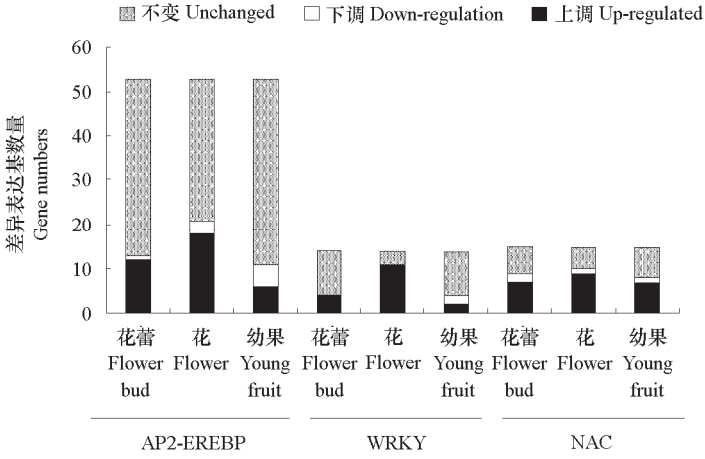


图 6 AP2-EREBP、WRKY 和 NAC 基因家族在枇杷 3 个比较组中的差异表达情况
Fig. 6 Different expression of AP2-EREBP, WRKY and NAC family members in three comparison groups in loquat

表 6 枇杷部分低温胁迫响应转录因子相对表达量

Table 6 Relative expression of partial low temperature responding transcription factors in loquat

Unigene 编号 Unigene ID	转录组 log ₂ 值 RNA-seq log ₂ FC			qRT-PCR 相对表达量 qRT-PCR relative expression			表达 Express	Nr 注释 Nr_ annotation	来源 Source
	花蕾 Flower bud	花 Flower	幼果 Young fruit	花蕾 Flower bud	花 Flower	幼果 Young fruit			
c106174.graph_c0	1.88	1.90	1.56	2.86 ± 0.32	3.45 ± 0.46	2.26 ± 0.34	上调 Up	ERF37	枇杷 <i>Eriobotrya japonica</i>
c123742.graph_c0	3.34	2.37	1.39	1.59 ± 0.23	4.78 ± 0.35	2.56 ± 0.21	上调 Up	ERF73	苹果 <i>Malus × domestica</i>
c125424.graph_c0	3.29	3.67	3.91	6.57 ± 0.58	4.23 ± 0.52	3.12 ± 0.29	上调 Up	ERF35	枇杷 <i>Eriobotrya japonica</i>
c126935.graph_c1	2.85	2.16	1.42	1.23 ± 0.15	1.85 ± 0.20	1.36 ± 0.16	上调 Up	ERF105	苹果 <i>Malus × domestica</i>
c129543.graph_c0	2.75	2.63	1.57	1.28 ± 0.12	2.35 ± 0.24	3.42 ± 0.21	上调 Up	RAV2	枇杷 <i>Eriobotrya japonica</i>
c46214.graph_c0	1.55	3.52	4.65	0.79 ± 0.12	5.48 ± 0.35	2.59 ± 0.38	上调 Up	ERF60	苹果 <i>Malus × domestica</i>
c126492.graph_c0	-1.90	-2.04	-2.54	-1.02 ± 0.11	-3.05 ± 0.36	-2.13 ± 0.22	下调 Down	ERF33	苹果 <i>Malus × domestica</i>
c142932.graph_c0	2.13	2.87	1.42	1.36 ± 0.21	1.25 ± 0.15	1.49 ± 0.23	上调 Up	WRKY33	苹果 <i>Malus × domestica</i>
c51471.graph_c0	4.92	4.59	4.00	6.89 ± 0.71	7.68 ± 0.68	6.21 ± 0.52	上调 Up	NAC 72	苹果 <i>Malus × domestica</i>
c130635.graph_c	1.92	2.95	1.78	2.06 ± 0.16	3.46 ± 0.42	2.76 ± 0.31	上调 Up	NAC74	梨 <i>Pyrus bretschneideri</i>
c136256.graph_c0	3.65	2.69	2.57	4.69 ± 0.53	3.76 ± 0.47	2.63 ± 0.18	上调 Up	NAC29	苹果 <i>Malus × domestica</i>
c136368.graph_c0	1.22	1.01	1.00	0.69 ± 0.10	1.38 ± 0.20	1.54 ± 0.23	上调 Up	NAC91	苹果 <i>Malus × domestica</i>

3 讨论

植物的非生物胁迫响应机制非常复杂，细胞膜上的特殊受体感应到应激信号后，将其传递给细胞第二信使，随后激活一系列的下游生理反应和相关基因表达（Lei et al., 2014）。转录组分析是一项灵敏而全面的技术，可用于检测非生物胁迫过程中的植物体内反应过程。本研究应用转录组测

序分析 3 个发育阶段的花和幼果对低温胁迫响应的差异, 结果表明碳水化合物代谢中的糖酵解/糖异生、乙醛酸和二羧酸代谢及磷酸肌醇代谢途径, 氨基酸代谢中的色氨酸代谢和酪氨酸代谢途径, 酯类代谢中的甘油磷脂代谢、 α -亚麻酸代谢和甘油酯代谢途径, 次生代谢中的异喹啉生物碱生物合成途径以及能量代谢中的硫代谢途径在 3 个比较组中都显著富集, 说明这几个途径都是枇杷花果响应低温胁迫的重要代谢途径。

碳水化合物代谢是植物最重要的基础代谢, 在本研究中也是对低温胁迫最为敏感的代谢通路, 其中涉及的差异基因最多的是糖酵解/糖异生途径, 这与先前在花后 4 周左右的幼果低温胁迫处理所得数据 (Xu et al., 2017) 一致。本试验中糖酵解/糖异生途径中的关键酶丙酮酸脱羧酶基因 (c127682.graph_c0, c128517.graph_c0, c107482.graph_c0) 和乙醛脱氢酶 (c129326.graph_c0) 基因在 3 个比较组中都显著上调表达, 说明该途径在枇杷响应低温胁迫过程中具有重要作用。在小麦 (Hamilton et al., 2001) 和水稻 (Wang et al., 2014) 中也有研究表明 Al 胁迫导致糖酵解/糖异生途径相关基因表达显著上调。这可能是因为植物抵御胁迫环境需要消耗大量的能量, 而糖酵解途径可以提供部分能量, 另外, 糖酵解途径可以为磷酸戊糖途径等其他代谢途径提供中间产物 (Berg et al., 2010)。

氨基酸代谢途径涉及到植物蛋白、激素和酶代谢, 并且能降解为葡萄糖进入三羧酸循环 (Klowden, 2007)。氨基酸作为小分子也可以提高细胞质浓度, 从而提高植物的抗冻能力。Liu 等 (2017) 研究发现低温处理后菌丝中氨基酸含量显著上升。在拟南芥 (Klotke et al., 2004) 和黑麦草 (Bocian et al., 2015) 的研究中也发现低温处理后丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺和谷氨酸含量大量积累。在本研究中也观察到调节渗透胁迫的重要氨基酸脯氨酸含量在低温胁迫后显著高于对照。不同发育阶段的花果低温处理后色氨酸代谢和酪氨酸代谢途径都得到显著富集, 且幼果富集到的氨基酸代谢途径差异基因数量大于花和花蕾, 这说明氨基酸代谢在幼果中响应低温胁迫中更为重要。

膜系统是植物受低温冻害影响的主要部位 (Kawamura & Uemura, 2003)。MDA 是评价植物细胞膜系统损伤程度的重要指标。本研究中低温胁迫导致 MDA 显著增加, 表明细胞膜系统受到破坏。然而, 植物能通过增加细胞代谢活性以及不饱和脂肪酸含量和磷脂含量来应对低温胁迫 (Moellering et al., 2010)。Degenkolbe 等 (2012) 的研究表明高水平的饱和脂肪酸含量能有效防止细胞受低温破坏。在本研究中也观察到枇杷不同发育阶段的花和幼果低温胁迫后酯类代谢相关途径都得到显著富集。抗氧化酶系统也是细胞抵御自由基攻击, 维持细胞膜稳定的重要途径 (Mittler, 2002)。本研究中低温处理导致超氧阴离子产生速率显著升高, 相应地, 抗氧化酶系统中重要的抗氧化酶 SOD、APX 和 CAT 活性也明显升高, 这也表明抗氧化系统在枇杷花果抗低温过程中起到重要作用。

植物不同发育阶段对低温的敏感性不同, 从生理数据看, 枇杷花蕾、花和幼果的抗低温能力存在一定差异, 这可能与组织以及细胞结构有关, 也可能与细胞内部特有的代谢机制相关。本研究中发现“苯丙烷类生物合成”途径在枇杷花蕾阶段比较组中富集水平较高且差异基因数量最多, 在花中也得到显著富集。苯丙烷类代谢相关途径在植物抗逆机制中的作用已有多篇文献报道, 如杜文丽等 (2021) 对低温胁迫下苦瓜叶片的差异基因进行分析, 发现低温处理后苯丙烷类代谢相关途径得到显著富集; 张飞等 (2019) 认为苯丙烷类生物合成、苯丙氨酸代谢、类黄酮生物合成等 3 个途径可能是高粱不同材料耐盐性差异较大的重要原因。本结果表明“苯丙烷类生物合成”途径是枇杷花蕾和花抵御冻害胁迫的主要途径之一, 也可能是枇杷花蕾和花抗冻能力要强于幼果的重要原因之一, 其具体机制需要进一步深入研究。

大量研究表明 AP2-EREBP、WRKY 和 NAC 这几类转录因子在调节植物低温胁迫应答网络中起着关键性调控作用 (Liu et al., 1998; Zou & Yu, 2010; Nakashima et al., 2012; Kovi et al., 2016)。在本研究中这 3 类转录因子在所有转录因子家族中数量最多, 其中 AP2-EREBP 在 3 个比较组中差异表达基因最多, 说明该家族基因在枇杷花果响应冻害胁迫过程中起重要作用。类似地, 研究发现木薯中 6 个 AP2-EREBP 转录因子参与早期低温胁迫响应过程 (An et al., 2012)。大部分 AP2-EREBP 家族相关转录因子在低温胁迫后会上调表达, 但本研究中发现转录因子基因 *ERF33* (c126492.graph_c0) 在 3 个比较组中都显著下调表达, 其可能在响应低温胁迫过程中起负调控作用, 具体功能需进一步研究。NAC 家族在植物响应低温胁迫中的作用也多有报道。在水稻中发现 *OsNAC5*、*OsNAC6*、*OsNAC045* 和 *OSNAP* 等 NAC 家族基因响应低温胁迫, 相关基因在水稻中超表达能增强植株的抗低温能力 (Nakashima et al., 2007; Zheng et al., 2009; Takasaki et al., 2010; Chen et al., 2014)。Qu 等 (2016) 发现过表达黄花苜蓿中的转录因子基因 *MjNAC3* 能增强蒺藜苜蓿的耐寒性。从青等 (2020) 发现在拟南芥中异源表达巨桉 *EgrNAC1* 能提高其抗寒性和对干旱、高盐的敏感性。本研究中枇杷经低温处理后上调表达的 NAC 转录因子基因要多于下调表达, 说明受低温诱导正向调控的 NAC 家族成员较多。WRKY 蛋白广泛参与植物生长发育代谢以及各种生物、非生物胁迫响应过程, 能够通过不同的信号转导途径参与植物的低温胁迫应答。如在紫花苜蓿中研究发现低温显著诱导 *MsWRKY42* 增强表达 (刘佼佼 等, 2020); Zou 等 (2010) 研究发现花粉中特异表达的 *AtWRKY34* 能负调控 CBF 介导的低温应答途径; 水稻中受低温诱导表达的 *OsWRKY71* 能激活下游基因的表达, 提高植株的耐低温能力 (Kim et al., 2016)。本研究结果也显示 WRKY 转录因子家族多个成员受低温调控, 但只有 1 个基因 (c142932.graph_c0) 在 3 个比较组中均显著上调。不同转录因子成员表达丰度在枇杷不同发育阶段花果中响应低温胁迫的过程中变化不一致, 可能是其不同发育阶段的功能有所差异, 需要进一步研究。

References

- An D, Yang J, Zhang P. 2012. Transcriptome profiling of low temperature treated cassava apical shoots showed dynamic responses of tropical plant to cold stress. *BMC Genomics*, 13: 64.
- Anders S, Huber W. 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*, 11: R106.
- Bates L S, Waldren R P, Teare I D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*, 39: 205 - 207.
- Beauchamp C O, Fridovich I. 1981. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*, 44: 867 - 880.
- Berg J M, Tymoczko J L, Stryer L. 2010. *Glycolysis and gluconeogenesis*. Biochemistry, 7th edn. New York: WH Freeman.
- Bocian A, Zwierzykowski Z, Rapacz M, Koczyk G, Ciesiolka D, Kosmala A. 2015. Metabolite profiling during cold acclimation of *Lolium perenne* genotypes distinct in the level of frost tolerance. *J Appl Genet*, 56: 439 - 449.
- Bradford M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248 - 254.
- Chen J H, Tian Q A, Pang T, Jiang L B, Wu R L, Xia X L, Yin W L. 2014. Deep-sequencing transcriptome analysis of low temperature perception in a desert tree, *Populus euphratica*. *BMC Genomics*, 15 (1): 326.
- Chen Jun-wei, Sun Jun, Li Xiao-ying, Xu Hong-xia, Zhou Xiao-yin, Jiang Lu-hua. 2017. Study on later flowering cultivation techniques to avoid freezing in white loquat. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 58 (3): 417 - 419, 425. (in Chinese)
- 陈俊伟, 孙 钧, 李晓颖, 徐红霞, 周晓音, 姜路花. 2017. 白肉枇杷晚花避冻栽培技术探讨. *浙江农业科学*, 58 (3): 417 - 419, 425.
- Chen X, Wang Y, Lv B, Li J, Luo L, Lu S, Zhang X, Ma H, Ming F. 2014. The NAC family transcription factor OsNAP confers abiotic stress response through the ABA pathway. *Plant Cell Physiol*, 55: 604 - 619.

- Cheng H Y, Song S Q. 2008. Possible involvement of reactive oxygen species scavenging enzymes in desiccation sensitivity of *Antiaris toxicaria* seeds and axes. *J Integr Plant Biol*, 50: 1549 - 1556.
- Cong Qing, Ni Xiao-xiang, Cheng Long-jun. 2020. Ectopic express of *EgrNAC1* enhances cold tolerance and sensitivity to drought and salt in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Nuclear Agriculture Sciences*, 34 (7): 567 - 575. (in Chinese)
- 从 青, 倪晓祥, 程龙军. 2020. 异源表达 *EgrNAC1* 提高拟南芥抗寒性和对干旱、高盐的敏感性. *核农学报*, 34 (7): 567 - 575.
- Degenkolbe T, Giavalisco P, Zuther E, Seiwert B, Hinch D K, Willmitzer L. 2012. Differential remodeling of the lipidome during cold acclimation in natural accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 32: 972 - 982.
- Dhindsa R S, Plumb-Dhindsa P, Thorpe T A. 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane-permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J Exp Bot*, 32: 93 - 101.
- Du Wen-li, Chen Zhong-shan, Xu Rui-xiang, Xu Tong-wei, Gao Shan, Wen Qing-fang. 2021. Physiological response and differentially expressed genes analysis of transcriptome in *Momordica charantia* L. leaf under cold stress. *Journal of Nuclear Agriculture Sciences*, 35 (2): 338 - 348. (in Chinese)
- 杜文丽, 陈中钊, 许端祥, 徐同伟, 高山, 温庆放. 2021. 低温胁迫下苦瓜叶片转录组差异基因分析及生理响应特征. *核农学报*, 35 (2): 338 - 348.
- Elstner E F, Heupel A. 1976. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammonium chloride: a simple assay for superoxide dismutase. *Anal Biochem*, 70: 616 - 620.
- Fujikawa S, Kasuga J, Takata N, Arakawa K. 2009. Factors related to change of deep supercooling capability in xylem parenchyma cells of tress// Gusta L, Wisniewski M, Tanino K K. *Plant cold hardiness from the laboratory to the field*. Wallingford: CABI Press.
- Hamilton C A, Good A G, Taylor G J. 2001. Induction of vacuolar ATPase and mitochondrial ATP synthase by aluminum in an aluminum-resistant cultivar of wheat. *Plant Physiol*, 125: 2068 - 2077.
- Kawamura Y, Uemura M. 2003. Mass spectrometric approach for identifying putative plasma membrane proteins of *Arabidopsis* leaves associated with cold acclimation. *Plant J*, 36: 141 - 154.
- Kim C Y, Vo K, Nguyen C D, Jeong D H, Lee S K, Kumar M, Kim S R, Park S H, Kim J J, Jeon J S. 2016. Functional analysis of a cold-responsive rice WRKY gene, *OsWRKY71*. *Plant Biotechnol Rep*, 10 (1): 13 - 23.
- Klotke J, Kopka J, Gatzke N, Heyer A. 2004. Impact of soluble sugar concentrations on the acquisition of freezing tolerance in accessions of *Arabidopsis thaliana* with contrasting cold adaptation-evidence for a role of raffinose in cold acclimation. *Plant Cell Environ*, 27: 1395 - 1404.
- Klowden M J. 2007. *Physiological systems in insects*. Burlington: Academic Press.
- Kovi M R, Ergon A, Rognli O A. 2016. Freezing tolerance revisited effects of variable temperatures on gene regulation in temperate grasses and legumes. *Curr Opin Plant Biol*, 33: 140 - 146.
- Lei X, Xiao Y, Xia W, Mason A S, Yang Y, Ma Z, Peng M. 2014. RNA-seq analysis of oil palm under cold stress reveals a different C-repeat binding factor (CBF) mediated gene expression pattern in *Elaeis guineensis* compared to other species. *PLoS ONE*, 9: e114482.
- Liu Jiao-jiao, Wang Xue-min, Ma Lin, Cui Miao-miao, Cao Xiao-yu, Zhao Wei. 2020. Isolation, identification, and response to abiotic stress of *MsWRKY42* gene from *Medicago sativa* L. *Scientia Agricultura Sinica*, 53 (17): 3455 - 3466. (in Chinese)
- 刘佼佼, 王学敏, 马琳, 崔苗苗, 曹晓宇, 赵威. 2020. 紫花苜蓿 *MsWRKY42* 的分离、鉴定及其对非生物胁迫的响应. *中国农业科学*, 53 (17): 3455 - 3466.
- Liu J Y, Men J L, Chang M C, Feng C P, Yuan L G. 2017. iTRAQ based quantitative proteome revealed metabolic changes of *Flammulina velutipes mycelia* in response to cold stress. *J Proteom*, 156: 75 - 84.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10: 1391 - 1406.
- Lv J H, Liu Z B, Liu Y H, Ou L J, Deng M H, Wang J, Song J S, Ma Y Q, Chen W C, Zhang Z Q, Dai X Z, Zou X X. 2020. Comparative transcriptome analysis between cytoplasmic male sterile line and its maintainer during the floral bud development of pepper. *Horticultural Plant Journal*, 6 (2): 89 - 98.

- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*, 7: 405 – 410.
- Moellering E R, Muthan B, Benning C. 2010. Freezing tolerance in plants requires lipid remodeling at the outer chloroplast membrane. *Science*, 330: 226 – 228.
- Nakano Y, Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 22: 867 – 880.
- Nakashima K, Takasaki H, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki. 2012. NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. *BBA Gene Regul Mech*, 1819: 97 – 103.
- Nakashima K, Tran L S, Van Nguyen D, Fujita M, Maruyama K, Todaka D, Ito Y, Hayashi N, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2007. Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *Plant J*, 51: 617 – 630.
- Qu Y T, Mei D, Zhang Z Q, Dong J L, Tao W. 2016. Overexpression of the *Medicago falcata* NAC transcription factor *MfNAC3* enhances cold tolerance in *Medicago truncatula*. *Environ Exp Bot*, 129: 67 – 76.
- Takasaki H, Maruyama K, Kidokoro S, Ito Y, Fujita Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Nakashima K. 2010. The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. *Mol Genet Genom*, 284: 173 – 183.
- Trapnell C, Williams B A, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, Baren M J, Salzberg S L, Wold B J, Pachter L. 2010. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotech*, 28 (5): 511 – 515.
- Wang Z Q, Xu X Y, Gong Q Q, Xie C, Fan W, Yang J L, Lin Q S, Zheng S J. 2014. Root proteome of rice studied by iTRAQ provides integrated insight into aluminum stress tolerance mechanisms in plants. *J Proteom*, 98: 189 – 205.
- Xu H X, Li X Y, Chen J W. 2017. Comparative transcriptome profiling of freezing stress responses in loquat (*Eriobotrya japonica*) fruitlets. *J Plant Res*, 130: 893 – 907.
- Zhang F, Wang Y Q, Zhu K, Zhang Z P, Zhu Z X, Lu F, Zou J Q. 2019. Comparative transcriptome analysis of different salt tolerance sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) under salt stress. *Scientia Agricultura Sinica*, 52 (22): 4002 – 4015. (in Chinese)
- 张 飞, 王艳秋, 朱 凯, 张志鹏, 朱振兴, 卢 峰, 邹剑秋. 2019. 不同耐盐性高粱在盐逆境下的比较转录组分析. *中国农业科学*, 52 (22): 4002 – 4015.
- Zhang Y, Dong W, Zhao X H, Song A, Guo K W, Liu Z J, Zhang L S. 2019. Transcriptomic analysis of differentially expressed genes and alternative splicing events associated with crassulacean acid metabolism in orchids. *Horticultural Plant Journal*, 5 (6): 268 – 280.
- Zheng X, Chen B, Lu G, Han B. 2009. Overexpression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance. *Biochem Biophys Res Commun*, 379: 985 – 999.
- Zou C, Jiang W, Yu D. 2010. Male gametophyte-specific WRKY34 transcription factor mediates cold sensitivity of mature pollen in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 61 (14): 3901 – 3914.
- Zou C, Yu J. 2010. Analysis of the cold-responsive transcriptome in the mature pollen of *Arabidopsis*. *Plant Biol*, 53: 400 – 416.