

田雪慧, 郁继华, 颀建明. 转录组测序研究兰州百合抗冻关键基因及途径 [J]. 广东农业科学, 2019, 46(8): 35-43.

转录组测序研究兰州百合抗冻关键基因及途径

田雪慧^{1,2}, 郁继华², 颀建明²

(1. 杨凌职业技术学院生态环境工程分院, 陕西 杨凌 712100;
2. 甘肃农业大学园艺学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要:【目的】百合 (*Lilium*) 是国家卫生部首批公布的药食同源植物, 也是著名的观赏植物。低温冻害严重影响植物的产量和分布, 探究兰州百合对零下低温胁迫应答的分子机制。【方法】采用高通量 Illumina HiSeq 测序平台对兰州百合的 20℃ 常温对照与 -4℃ 寒冷处理 (D) 进行测序, 并对测序数据进行分析研究。【结果】处理 24 h 后检测到 24 465 个差异表达的基因, 筛选后获得 4 143 个表达量上升的基因和 4 415 个表达量下降的基因, 占差异表达基因总数的 10.27%。【结论】经富集分析认为, 与蛋白激酶、蛋白磷酸酶、碳代谢以及 ABA 等相关的基因可作为研究兰州百合零下低温响应机制的主要研究对象。qRT-PCR 分析表明, 随机选出的 10 个差异性表达基因的表达趋势与高通量测序结果相一致。此外, 吡嗪-3-甘油磷酸合成酶、蛋白磷酸酶、己糖激酶、钙结合蛋白、叶绿素 a/b 结合蛋白等基因可作为与兰州百合寒冷响应相关的应答候选基因, 为揭示兰州百合抗冻分子机制奠定了基础。

关键词: 兰州百合; 低温胁迫; 转录组测序; 差异基因; 抗冻基因; 通路分析; 分子机制

中图分类号: S682.2+9

文献标志码: A

文章编号: 1004-874X (2019) 08-0035-09

Study on Key Anti-freeze Genes and Pathways of Lanzhou Lily (*Lilium davidii* var. *unicolor*) by Transcriptome Sequencing

TIAN Xuehui^{1,2}, YU Jihua², XIE Jianming²

(1. Department of Ecological and Environmental Engineering, Yangling Vocational Technical College, Yangling 712100, China;
2. College of Horticulture, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract:【Objective】Lily (*Lilium*) is one of the first medical and edible plants published by the Ministry of Health, and is also a famous ornamental plant. As low temperature freezing damage seriously affecting the yield and distribution of plants, the study was to explore the molecular mechanism of the response of Lanzhou lily to subzero temperature stress.【Method】By using Illumina HiSeq transcriptome sequencing platform, sequencing was conducted to Lanzhou lily (*L. davidii* var. *unicolor*) exposed to two different temperature conditions, including, normal temperature treatment at 20℃ (CK) and cold treatment at -4℃ (D), and the sequencing data were analyzed.【Result】After being treated for 24 h, a total of 24 465 differentially expressed genes (DEGs) were identified, which included 4 143 significantly upregulated genes and 4 415 significantly downregulated genes, accounting for 10.27% of the total number of DEGs.【Conclusion】After enrichment analysis, DEGs

收稿日期: 2019-05-16

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2016YFD0201005); 杨凌职业技术学院自然科学基金 (A2017027); 杨凌示范区食用百合引种示范项目 (TS-2016-06)

作者简介: 田雪慧 (1978—), 女, 在读博士生, 副教授, 研究方向为设施栽培和花卉生产与应用, E-mail: txh_1214@163.com

通信作者: 颀建明 (1970—), 男, 博士, 教授, 研究方向为设施蔬菜栽培, E-mail: xiejianming@gsau.edu.cn

related to protein kinase, protein phosphatase, carbon metabolism and ABA could be selected as main research objects for further studying the subzero cold response mechanism of Lanzhou lily. qRT-PCR analysis showed that the expression trend of 10 randomly selected DEGs coincided with the results of high-throughput sequencing. In addition, indol-3-glycerophosphate synthase, protein phosphatase, glycokinase, calcium-binding protein, and chlorophyll a/b binding protein were also selected as candidate genes that related to the anti-freeze responses of Lanzhou lily, Which lay a foundation for revealing the underlying mechanism of anti-freeze molecular of Lanzhou lily.

Key words: Lanzhou lily; low temperature stress; transcriptome sequencing; differential gene; anti-freeze gene; path analysis; molecular mechanism

【研究意义】百合 (*Lilium*) 是国家卫生部首批公布的药食同源植物, 也是著名的观赏植物^[1]。食用百合是营养价值很高的特种蔬菜, 其鳞茎含碳水化合物、蛋白质、果胶、脂肪、钾、磷以及钙、铁、百合甙等抗癌性植物碱和多种维生素, 兼具保健功能, 产品畅销中国及东南亚地区, 在世界范围享有盛誉, 市场前景十分广阔。兰州百合 [*Lilium davidii* Duch. var. *unicolor* (Hong) Cotton] 微甜、口感好, 是食用百合中的精品, 生长在 103° 54' 54" E、36° 06' 12" N、海拔 2 000 多米的七里河区, 是食用百合中的耐寒品种代表^[2]。温度是植物生长最重要的环境因子之一, 通过对兰州百合抗冻转录组的研究, 筛选出百合抗冻的基因及抗冻相关通路, 为后续兰州百合 SSR 标记开发、抗寒性相关基因的发掘及分子育种提供借鉴。

【前人研究进展】目前, 对百合抗寒性研究集中于亚洲百合^[3]、东方百合^[4]、卷丹百合^[5]等观赏百合品种, 对百合耐寒的研究主要集中在细胞膜透性和保护酶系统方面, 相对电导率、脂膜氧化产物丙二醛、抗氧化酶类 (SOD、CAT、POD) 活性通常被作为植物耐寒性生理指标^[6-7]。HOSHI 等^[8]对百合在农杆菌介导下转录组进行研究, 建立了东方百合杂交品种的转基因生产体系; 杜方等^[9]对百合不同器官的转录数据进行测序并开发了 SSR 标记。

【本研究切入点】关于抗寒食用百合代表——兰州百合的抗寒转录因子研究至今仍是空白。本研究运用先进的 Illumina 高通量测序平台的转录组测序技术, 分别对正常温度条件下和零下超低温条件下生长的兰州百合苗期叶片的转录产物 mRNA 进行测序, 比较常温与零低温下差异表达的基因及通路, 了解兰州百合超低温胁迫下的基因表达状况。【拟解决的关键问题】进一步对差异表达基因进行 GO、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 注释和富集

分析, 以期进一步筛选出与兰州百合抗冻相关的基因^[10]。

1 材料与方法

1.1 试验材料

在兰州市七里河区采集露地自然生长成熟的兰州百合种球, 贮藏于 2℃ 冰箱 110 d^[11]后, 种植于 15 cm 口径的花盆中, 置于 20℃ 智能低温人工气候箱 (RXZ-0288 型) 中培养, 相同的水肥条件管理。将生长至 15 cm 左右的百合幼苗放在智能低温人工气候箱中进行 -4℃ 低温处理^[12], 降至目标温度后维持 24 h^[13-14], 以室温 20℃ 作为对照, 每个处理 3 次重复。

1.2 试验方法

1.2.1 转录测序 分别取 3 份 20℃ 与 -4℃ 的兰州百合叶片样品, 采用 TRIzol 法提取总 RNA^[15], 并对 RNA 浓度、纯度、完整性进行检测。样品检测合格后, 用带有 Oligo (dT) 的磁珠富集真核生物 mRNA^[16]。随后加入 fragmentation buffer 将 mRNA 打断成短片段, 以打断后的 mRNA 为模板合成一链 cDNA, 再合成二链 cDNA。然后纯化、修复, 再用 AMPure XP beads 进行片段大小选择, 最后进行 PCR 扩增, 纯化 PCR 产物, 得到最终文库。质检合格后使用 Illumina 4000 高通量测序平台 (HiSeq/MiSeq) 进行测序^[16]。由 Illumina 4000 高通量测序平台测序所得的数据称为 raw reads 或 raw data。然后进行转录结果组装与拼接, 并进行基因功能注释与表达水平分析。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 验证 随机选取 10 个差异性表达的基因进行 qRT-PCR 分析验证。以 20℃ 与 -4℃ 的兰州百合叶片 RNA 为材料, 采用 HiScript II QRT SuperMix for qPCR 试剂盒反转录合成 cDNA, 设计引物 (表 1) 进行 qRT-PCR, 以 *Actin* 基因作为内参^[17]。各处理均设 3 次重复, 计算基因的相对表达量。

表 1 定量 PCR 引物序列
Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

基因 ID Gene ID	正向引物 (5' → 3') Forward primer(5' → 3')	反向引物 (5' → 3') Reverse primer(5' → 3')
c166605_g1	TGGTCTGGATGTGTTGGC	GTCATAATTGAGTTTGTGGGAG
c199368_g1	GCGGGCCAGCTCCTTGTA	GCGGGTTCAGCGTGCAGGA
c171769_g1	GCAACATCATCAACTCTGG	ATGGAAGCAATCACCTAAGT
c164813_g2	TCCAGTCCACCACAGTCT	GCCAGCAGAACAGTCAAG
c153721_g1	GTTGAGCCAGCCTACATC	CTAGACTCCGCACCTCTGT
c76799_g1	TGGAGCAATTAGGCCCGGATGA	CACCAGAGCCAGGCCCAACT
c153860_g1	GCGCGAGTACGAGCTGGTGA	GCCCTCGTGGTCTTGTCCG
c149445_g1	TGAAAAGGTGAGGTCACCAG	GAACAGAGATGAAAAGAAAGTTGG
c115377_g1	GCTTGTGGCTGTGATGATTAAG	TCCACAACCTATTATCACCTCT
c155535_g1	GCAAGCAAAGCCTTGGATC	ATTGCCGGAGATCAAACG
<i>Actin</i>	TGAGCACATTCACGAGA	CCATAGACAAAGCCATCG

2 结果与分析

2.1 测序结果与 Trinity 拼接

兰州百合 20℃ 转录组共得到 56 882 837 raw reads, 56 456 634 clean reads, Q_{20} 值为 94.56%, Q_{30} 值为 87.32%, 序列碱基 GC 含量为 44.84%; -4℃ 转录组共得到 58 092 923 raw reads, 57 800 442 clean

reads, Q_{20} 值为 94.51%, Q_{30} 值为 87.32%, 序列碱基 GC 含量为 44.54%。表明兰州百合转录组测序质量较高, 可为后续的数据组装与分析提供良好基础。经过 Trinity 转录本拼接和 CD-HIT 去冗余序列处理结果见表 2。Unigene 序列长度 < 300 的最多 (图 1), 说明转录拼接较好, 利于后续分析研究。

表 2 处理前后序列数量、N50、N75、N90 长度和总碱基数统计
Table 2 Sequence number, length of N50, N75, N90 and total base number by different data processing

序列 Sequence	转录本 /unigene 长度 Transcript /unigene length			N50	N75	N90	总碱基数 Total base number
	最短 Shortest	中间值 Median	最长 Longest				
	Transcript	201	341				
Unigene	201	327	21073	757	350	246	133179110

注: N50、N75、N90 分别为不小于总长 50%、75%、90% 的拼接转录本的长度。

Note: N50, N75 and N90 represent length of the transcripts of not less than 50%, 75% and 90%, respectively.

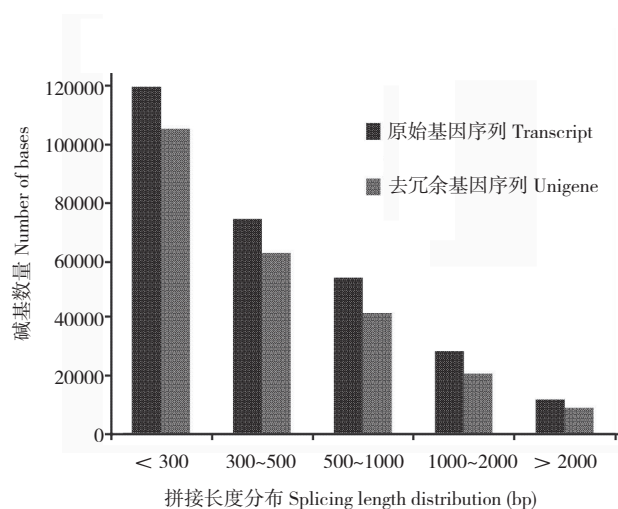


图 1 拼接后 Unigene 长度分布

Fig. 1 Length distribution of all unigenes after splicing

2.2 基因功能注释结果

对获得的转录组序列进行数据库比对注释可知, 注释的 Unigene 数量共 238 301 个, Nr (NCBI 蛋白质非冗余数据库) 注释的 Unigene 数量为 65 314 个、占 27.41%, KOG (真核生物直系同源基因数据库) 注释的 Unigene 数量为 42 138 个、占 17.68%, GO 库注释的 Unigene 数量为 35 244 个、占 14.79%, Swiss-Prot 注释的 Unigene 数量为 46 337 个、占 19.44%, Pfam 注释的 Unigene 数量为 58 605 个、占 24.59% (表 3)。

2.2.1 GO 分类 对 Unigene 进行 GO 注释后, 按照成功注释到生物学过程 (Biological Process, BP)、细胞组分 (Cellular Component, CC) 和分

表 3 Unigenes 注释结果统计
Table 3 Annotation statistics for all Unigenes

数据库 Database	基因数量 Number of Unigenes	占比 Proportion (%)
NR	65314	27.41
NT	37916	15.91
KO	26291	11.03
SwissProt	46337	19.44
Pfam	58605	24.59
GO	35244	14.79
COG/KOG	42138	17.68
所有数据库都有注释 All databases	9695	4.07
至少在一个数据库里有注释 At least one database	84559	35.48
合计 Total	238301	100

子功能 (Molecular Function, MF) 的基因进行统计。其中生物学过程中较多 Unigene 注释有高分子代谢过程 28 326 个、初级代谢过程 16 483 个、细胞代谢过程 38 883 个；分子功能中较多 Unigene 注释有转移酶活性 5 090 个、水解酶活性 5 153 个、跨膜转运功能 3 069 个；细胞组分中较多 Unigene 注释有细胞壁 8 663 个、细胞膜 7 832 个、细胞器 9 581 个 (图 2)。

2.2.2 KEGG 分类 由表 3 可知, 兰州百合测序结果有 26 291 条 Unigene 注释到 KEGG 数据库,

涉及 5 大类代谢通路。其中代谢作用中注释 4 914 条、占 40.66%；有机系统中注释 905 条、占 7.49%；细胞过程中注释 923 条、占 7.64%；遗传信息处理中注释 3 609 条、占 29.86%；环境信息处理中注释 1 734 条、占 14.35%。

2.3 基因表达差异分析结果

2.3.1 差异基因 GO 富集分析 将所有差异表达基因映射到 Gene Ontology 数据库的各个功能分类中, 计算每个分类的基因数目, 与整体基因组背景相比, 找出在差异表达基因中显著富集的功能分类。

对上调的差异基因进行富集分析, 结果 (图 4) 发现, 在细胞成分中, 差异基因富集效果较明显的有细胞核, 基因占比 13.81%；细胞内细胞器, 基因占比 16.06%；面上细胞器, 基因占比 16.06%。分子功能中差异基因富集效果较明显的功能有钙离子结合, 基因占比 3.52%；离子束缚, 基因占比 8.81%；阳离子绑定, 基因占比 8.81%；金属离子结合, 基因占比 8.81%。生物过程中上调基因富集效果较明显的功能有水响应, 基因占比 1.27%；非生物刺激反应, 基因占比 1.37%；磷酸化作用, 基因占比 8.62%。结果表明, 含量增加的差异基因在细胞成分、分子功能、生物过程三方面主要调节物质的合成代谢。

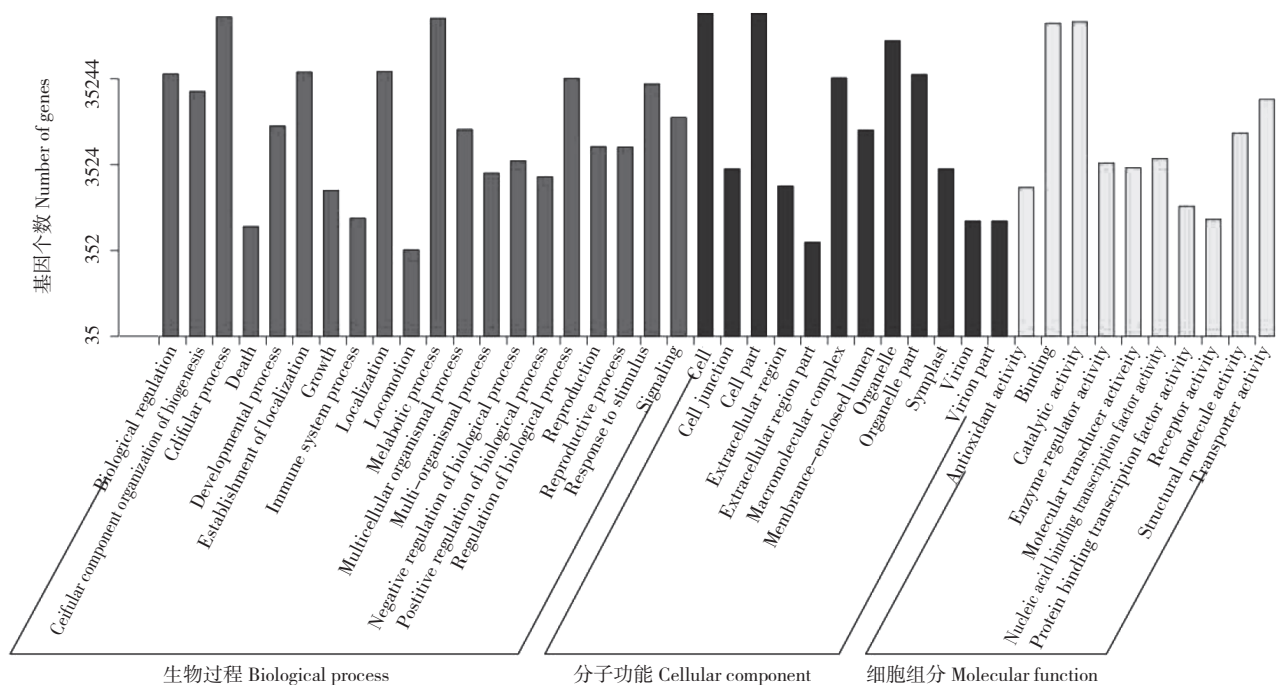


图 2 GO 分类

Fig. 2 GO function classification

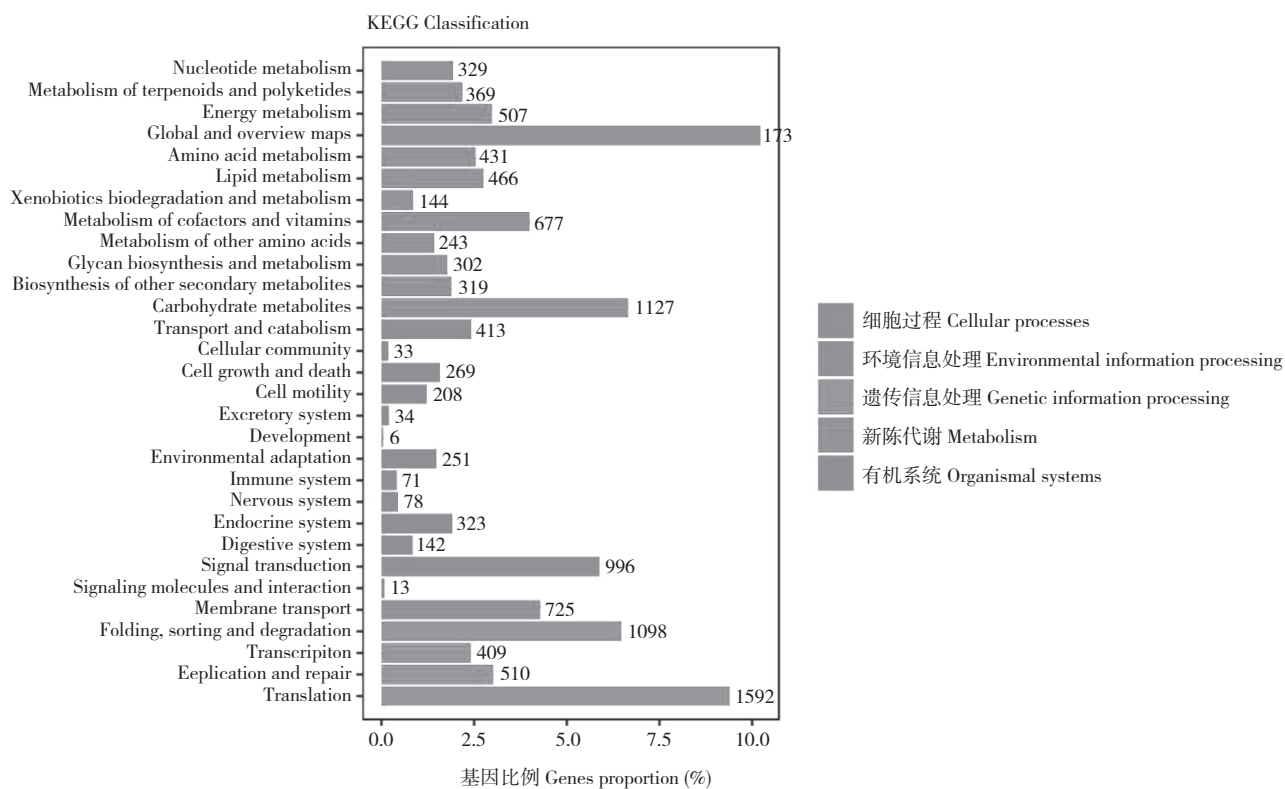


图3 KEGG 代谢通路
Fig. 3 KEGG metabolic pathway

对下调的差异基因富集分析，结果（图4）发现，差异基因主要富集在生物过程中。其中富集较为明显的是光合作用、光收获，基因占比1.65%；光合作用、光反应，基因占比1.65%。结

果表明，含量相对减少的差异基因主要调节生物过程中的光合作用过程。

2.3.2 差异基因KEGG富集分析 差异基因KEGG富集结果显示，常温(20℃)与超低温(-4℃)

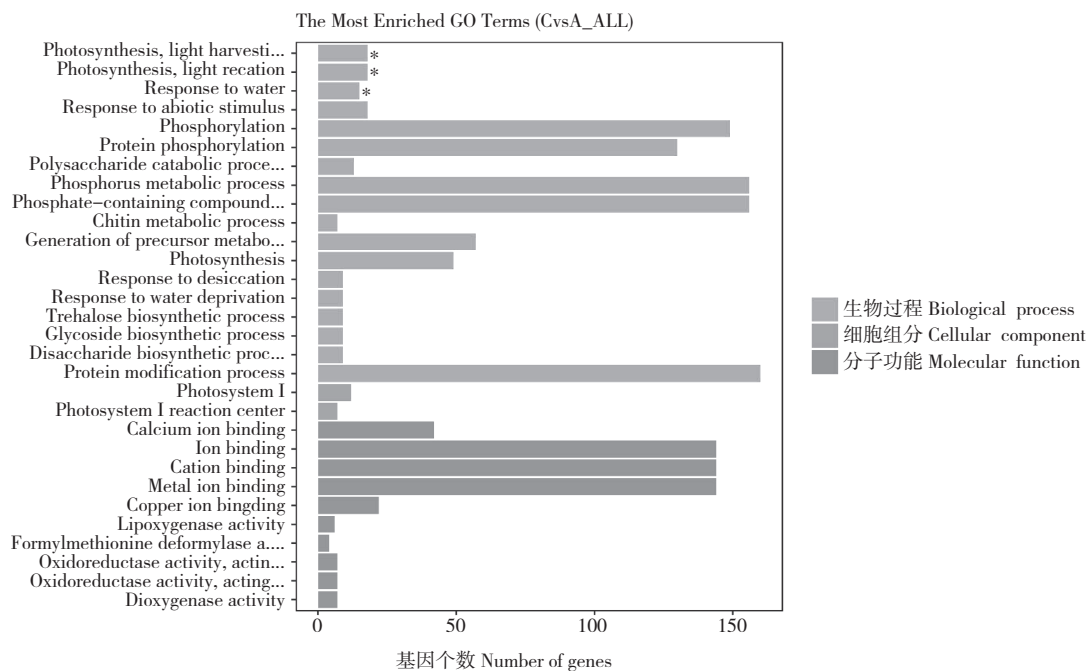


图4 差异基因(20℃ Vs -4℃)的GO富集结果
Fig. 4 GO enrichment result of differential genes (20℃ Vs -4℃)

下差异表达基因共有 5 848 个，其中上调的差异基因有 3 478 个，下调的差异基因有 2 370 个（图 5）。经分析后发现，与蛋白激酶、蛋白磷酸酶、碳代谢以及 ABA 等相关的基因显著变化；此外，吲哚-3-甘油磷酸合成酶、蛋白磷酸酶、己糖激酶、钙结合蛋白、叶绿素 a/b 结合蛋白等相关基因显著上调或下调。

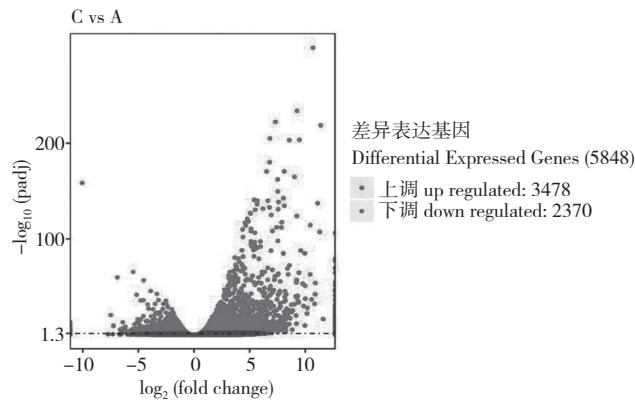


图 5 差异表达基因 (20°C Vs -4°C) 火山图
Fig. 5 Differential expressed genes (20°C Vs -4°C)

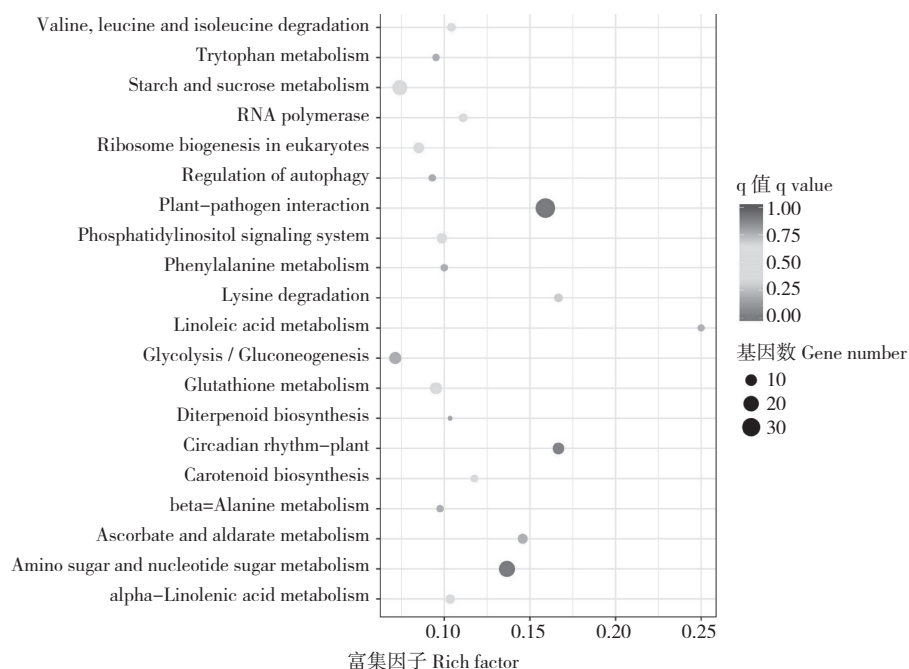
Pathway 显著性富集分析以 KEGG Pathway 为单位，应用超几何检验，找出差异基因相对于所有注释的基因显著富集的 Pathway。处理后含量增加的差异基因显著富集的通路有植物病原菌互作、氨基酸和核苷酸糖代谢、植物昼夜节律、亚油酸代谢等（图 6）。如上调的差异基因 c156798_g2、c163371_g2 (calcium-dependent protein kinase, EC:2.7.11.1)、c166423_g2、c145559_g1 (respiratory burst oxidase, EC:1.6.3.- 1.11.1)、c162064_g1、c164545_g2、c166855_g1(3.1027) c145934_g1(8.2812) c101051_g1(4.9356)、c144017_g1(Inf) c144017_g2(Inf) c159000_g1(2.9702) c140553_g1(9.9651) c170503_g1(Inf)、c140013_g1(3.7728)、c154815_g1(Inf) c173122_g1(7.8456) c168962_g1(Inf) c163915_g1(Inf)、c156536_g2(2.9685) c156536_g1(1.2021) (calmodulin)、c147877_g2 (mitogen-activated protein kinase kinase 4/5, EC:2.7.12.2) 主要调节植物病原互作，病原互作相关基因与植物的抗性息息相关；上调的差异基因 c154320_g1、c125968_g1(5.6972) c171764_g2(5.6213)、c172816_g3(5.9018)、c237479_g1(3.5347) c161991_g1(2.2688)、c172816_

g4(2.2231)、c113669_g1(5.4648) c161991_g2(1.9362)、c106411_g1 调节氨基酸和核苷酸糖代谢；上调的差异基因 c151010_g1、c156146_g2(2.1536) c171563_g1(2.3117)、c156146_g1、c167910_g3、c152959_g1、c131089_g1(Inf) c144654_g1(6.9885) 主要调节植物昼夜节律。

处理后下调的差异基因显著富集的通路有光合作用、光合作用-天线蛋白、吡啉和叶绿素代谢、光合生物体中的碳固定、脂肪酸生产等。如下调的差异基因 c237057_g1、c13699_g1、c237057_g1、c76799_g1、c158296_g1、c152833_g1、c152881_g1、c158839_g1、c134148_g1、c140011_g1、c153193_g1、c131998_g1、c48634_g1、c71692_g1、c42744_g1、c153649_g1 调节光合作用；下调的差异基因 c149517_g1、c139230_g1、c152435_g1、c149445_g1、c153860_g1、c115377_g1、c164577_g1、c155535_g1、c174985_g1、c157047_g1 调节光合作用-天线蛋白；下调的差异基因 c167743_g1、c167947_g1、c167743_g1、c71809_g1、c165450_g1 c168519_g1、c169028_g1 c133188_g1、c123480_g1、c185147_g2、c157598_g1、c157598_g1、c155686_g1、c166557_g2(-1.4097) c166557_g1(-1.5029) 调节吡啉调节叶绿素代谢；下调的差异基因 c104889_g2(-1.5635) c174574_g3(-3.7395)、c104889_g1、c71483_g1、c159323_g1、c172966_g1、c170442_g1、c162112_g2、c154502_g4、c43883_g1、c198353_g1、c168133_g3、c164307_g1 调节光合生物体中的碳固定；下调的差异基因 c134603_g2、c164323_g1、c166224_g1(-1.1149) c150017_g1(-1.3389)、c163278_g2、c148702_g1、c164323_g2、c134778_g1、c117604_g1 调节脂肪酸伸长（图 7）。

2.4 qRT-PCR 验证

为验证 RNA-seq 测序结果的可信度，随机选取 10 个差异表达基因，其中含上调的 5 条差异基因 (c166605_g1、c199368_g1、c171769_g1、c164813_g2、c153721_g1) 和下调的 5 条差异基因 (c76799_g1、c153860_g1、c149445_g1、c115377_g1、c155535_g1)，以 *Actin* 为内参进行 qRT-PCR 验证。由图 8 可知，10 个基因在低温胁迫下的表达程度不同，但表达趋势与高通量测序结果基本一致，即表明测序结果真实可靠。

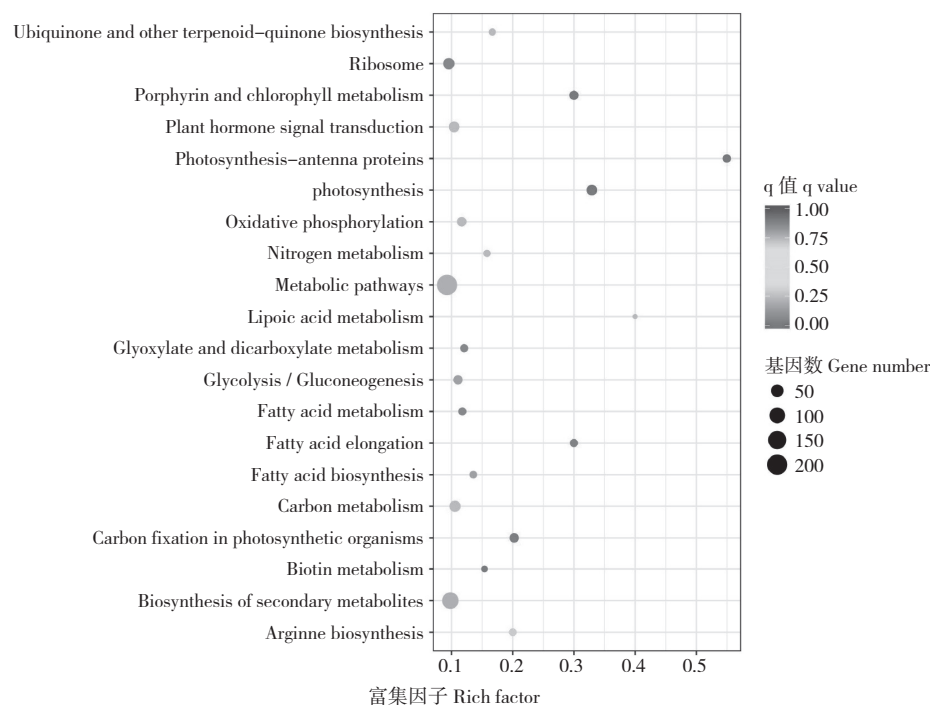


横坐标表示该通路下差异表达基因与注释到该通路的所有基因的比值，纵坐标为通路名称。其中点的大小表示富集的基因数目，越大表示富集的基因数目越多，颜色表示富集的可信度，其值越大表示富集效果越明显

The x-coordinate represents the ratio of differentially expressed genes in this pathway to all genes annotated into this pathway, and the y-coordinate represents the pathway name. The size of the center point indicates the number of enriched genes, the larger the point the more genes are enriched, and the color indicates the credibility of the enrichment, the larger the value the more obvious of the enrichment effect

图 6 上调差异基因 (20°C Vs -4°C) 参与的 KEGG 代谢通路富集结果

Fig. 6 Differential up-regulation genes (20°C Vs -4°C) assignment to KEGG metabolic pathway



横坐标表示该通路下差异表达基因与注释到该通路的所有基因的比值，纵坐标为通路名称。其中点的大小表示富集的基因数目，越大表示富集的基因数目越多，颜色表示富集的可信度，其值越大表示富集效果越明显

The x-coordinate represents the ratio of differentially expressed genes in this pathway to all genes annotated into this pathway, and the y-coordinate represents the pathway name. The size of the center point indicates the number of enriched genes, the larger the point the more genes are enriched, and the color indicates the credibility of the enrichment, the larger the value the more obvious of the enrichment effect

图 7 下调差异基因 (20°C Vs -4°C) 参与的 KEGG 代谢通路富集结果

Fig. 7 Differential down-regulation genes (20°C Vs -4°C) assignment to KEGG metabolic pathway

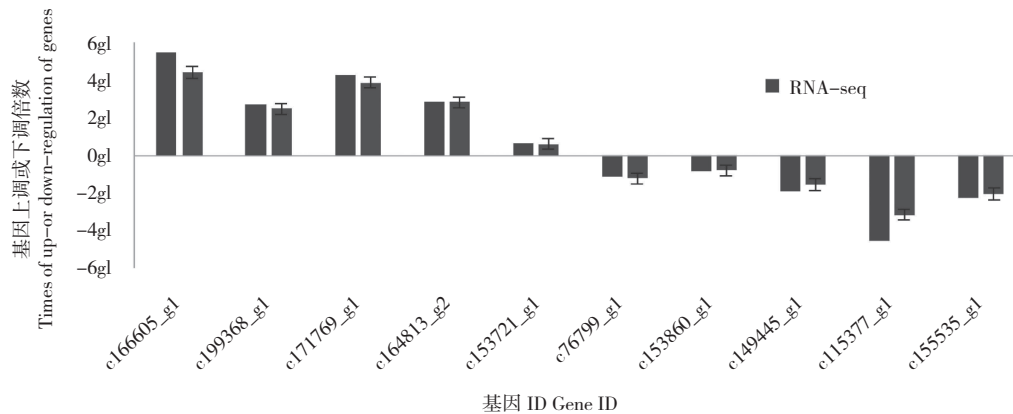


图8 差异基因的 qRT-PCR 验证
Fig. 8 Validation of DEGs by qRT-PCR

3 讨论

前人关于百合抗冻分子机制研究较少,不良生长环境尤其是零下低温胁迫是植物生长发育中常遇到的自然灾害。本研究采用先进的测序平台 Illumina 4000 高通量测序平台对常温 (20℃) 与零下低温 (-4℃) 处理的兰州百合进行测序,确保测序数据的准确性和序列的高度丰富性^[18]。测序结果在 NCBI 数据库中共注释到了 238 301 条 Unigene,但注释到每个库中的基因最大不超过 27.41%,说明还有很多基因没有被注释到 NCBI 库中,原因可能是数据库信息不足、测序结果中有新基因和基因片段短等。因此,在后续的研究中,我们可以进一步比对测序结果中差异极显著的基因片段,进一步深入发掘兰州百合抗冻转录新基因。

根据 KEGG 富集分析结果,可以看出共有 25 条差异基因参与病原互作途径,10 条差异基因参与氨基酸和核苷酸糖代谢途径,8 条差异基因参与植物昼夜节律途径,15 条差异基因参与叶啉调节叶绿素代谢途径,16 条差异基因参与光合作用途径,10 条差异基因调节光合作用-天线蛋白途径,13 条差异基因调节光合生物体中的碳固定途径,9 条差异基因调节脂肪酸伸长途径。因此我们可以深入研究以上通路以进一步揭示兰州百合抗冻的分子机制。另外也可以将兰州百合相关的代谢产物作为研究对象进行深入探究。

4 结论

本研究对兰州百合转录组测序后通过 KEGG 通路分析,结果检测到 24 465 个差异表达的基因,筛选后获得 8 558 条差异表达基因,共占差异表

达基因总数的 10.27%。经富集分析后发现,与蛋白激酶、蛋白磷酸酶、碳代谢以及 ABA 等相关的基因可以作为研究兰州百合寒冷响应机制的主要研究对象。qRT-PCR 分析结果表明,随机选出的 10 个差异性表达基因的表达趋势与高通量测序结果相一致。此外,还候选了吡啶-3-甘油磷酸合成酶、蛋白磷酸酶、己糖激酶、钙结合蛋白、叶绿素 a/b 结合蛋白等基因作为与兰州百合零下低温响应相关的应答候选基因,为揭示兰州百合抗冻分子机制奠定了基础。

参考文献 (References):

- [1] 万珠珠,牛来春,谭秀梅,刘敏,吴亮,董草.三种食用百合种质资源限制生长保存及遗传稳定性研究[J].北方园艺,2016(13):89-92. doi:10.11937/bfyy.201613024.
WAN Z Z, NIU L C, TAN X M, LIU M, WU L, DONG C. Studies on the limited growth preservation and genetic stability of three edible lily germplasm resources [J]. *North Garden*, 2016(13): 89-92. doi:10.11937/bfyy.201613024.
- [2] 李玉帆,明军,刘新艳,王良桂,袁素霞,刘春,王莹,徐雷锋,袁迎迎.15个百合种和品种的食用性比较研究[J].园艺学报,2013,40(S):2693.
LI Y F, MING J, LIU Y Y, WANG L G, YUAN S X, LIU C, WANG Y, XU L F, YUAN Y Y. Comparative study on edibility of 15 lily species and varieties [J]. *Journal of Horticulture*, 2013, 40(S): 2693.
- [3] HUANG J, LIU X H, WANG J M, LU Y M. Transcriptomic analysis of Asiatic lily in the process of vernalization via RNA-seq [J]. *Molecular Biology Reports*, 2014(41): 3839-3852. doi: 10.1007/s11033-014-3250-2.
- [4] BAKHSHAIE M, KHOSRAVI S, AZADI P. Biotechnological advances in Liliaceae [J]. *Plant Cell Reports*, 35 2016, 8: 1799-1826. doi: 10.1007/s00299-016-2017-8.
- [5] 王晶慧.野生百合卷丹 (*Milium lancifolium*) 响应低温信号的分子机制研究[D].北京:北京林业大学,2015.

- WANG J M. The molecular mechanism of the cold response and signaling pathways in *Milium lancifolium* [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2015.
- [6] 鲁中爽, 刘思言, 李广隆, 王蕊, 刘明明, 么梦凡, 关淑艳, 姚丹. 大豆油脂的合成途径及关键酶 *GPAT* 基因的研究进展 [J]. 广东农业科学, 2018, 45(11): 7-13.
- LU Z S, LIU S Y, LI G L, WANG R, LIU M M, YAO M F, GUAN S Y, YAO D. The synthetic pathway of soybean oil and the research progress of its key enzyme *GPAT* gene [J]. *Guangdong Agricultural Science*, 2018, 45(11): 7-13.
- [7] WANG M, ZHANG X N, LIU J H. Deep sequencing-based characterization of transcriptome of trifoliolate to cold stress [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 555. doi: 10.1186/s12864-015-1629-7.
- [8] HOSHI Y, KONDO M, MORI S, ADACHI Y, NAKANO M, KOBAYASHI H. Production of transgenic lily plants by Agrobacterium-mediated transformation [J]. *Plant Cell Reports*, 2004, 22: 359-364. doi: 10.1007/s00299-003-0700-z.
- [9] 杜方. 百合不同器官转录组分析及 SSR 标记开发应用 [J]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- DU F. Transcriptome analysis of different lily organs and development and applications of SSR markers [J]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014.
- [10] 储俊, 许娜, 钱立生, 赵岩. 百合转基因体系及分子育种相关基因的研究进展 [J]. 安徽科技学院学报, 2013, 27(6): 26-33.
- CHU J, XU N, QIAN L S, ZHAO Y. Research progresses of transgenic system and molecular breeding related genes in lily [J]. *Journal of Anhui University of Science And Technology*, 2013, 27(6): 26-33.
- [11] 李明玺, 王敏, 甘玉迪, 刘洋, 黄莹捷, 万春鹏. 靖安白茶芽和叶的转录组数据组装及基因功能注释 [J]. 现代食品科技, 2018, 34:35.
- LI M X, WANG M, GAN Y D, LIU Y, HUANG Y J, WAN C P. Transcriptome analysis and gene function annotation of buds and leaves of *Camellia sinensis* Cultivar Jing' anbaicha [J]. *Modern Food Technology*, 2018, 34:35.
- [12] 冷暖, 刘晓巍, 张娜, 许立新. 草地早熟禾干旱胁迫转录组差异性分析 [J]. 草业学报, 2017, 26(12): 128-137. doi:10.11686/cyxb2017130.
- LENG N, LIU X W, ZHANG N, XU L X. Differential gene analysis of *Poa pratensis* in response to drought stress [J]. *Journal of Grass Industry*, 2017, 26(12): 128-137. doi:10.11686/cyxb2017130.
- [13] ZHANG X Y, ZHANG J Z, ZHANG W W. Transcriptome sequencing and de novo analysis of *Rosa multiflora* under cold stress [J]. *Acta Physiol Plant*, 2016, 38: 164.
- [14] 曾宪海, 焦云飞, 廖子荣, 潘登浪, 林位夫. 广东不同地区引种油棕叶片解剖结构对油棕抗寒力的影响 [J]. 广东农业科学, 2018, 45(8): 50-58.
- ZENG X H, JIAO Y F, LIAO Z R, PAN D L, LIN W F. Effects of leaf anatomical structure features on cold resistance of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) introduced in different regions in Guangdong Province [J]. *Guangdong Agricultural Science*, 2018, 45(8): 50-58.
- [15] SHAFIEE-MASOULEH S S, HATAMZADEH A, SAMIZADEH H. Enlarging bulblet by magnetic and chelating structures of nano-chitosan as supplementary fertilizer in *Lilium* [J]. *Horticulture Environment, and Biotechnology*, 2014, 55(6): 437-444. doi: 10.1007/s13580-014-0175-6.
- [16] 李桂荣, 连艳会, 程珊珊, 辛董董, 牛生洋, 扈惠灵. 低温胁迫下不同无核葡萄品种抗寒性的分析 [J]. 西南农业学报, 2018, 31(11): 2399-2406.
- LI G R, LIAN Y H, CHENG S S, XIN D D, NIU S Y, HU H L. Analysis of cold resistance of different seedless grape varieties under low temperature stress [J]. *Southwest Agricultural Journal*, 2018, 31(11): 2399-2406.
- [17] 王茂辉, 钟春燕, 罗文龙, 聂金泉, 郭涛, 王慧, 陈志强. 基于分子标记和高通量测序的基因精细定位 [J]. 广东农业科学, 2018, 45(10): 1-8.
- WANG M H, ZHONG C Y, LUO W L, NIE J Q, GUO T, WANG H, CHEN Z Q. Fine mapping of genes based on molecular markers and high-throughput sequencing [J]. *Guangdong Agricultural Science*, 2018, 45(10): 1-8.
- [18] REVILLA P, RODRIGUEZ M, ORDASA. Association mapping for cold tolerance in two large maize inbred panels [J]. *BMC Plant Biology*, 2016, 16:127. doi:10.1186/s12870-016-0816-2.

(责任编辑 崔建勋)