

引文格式: 刘烨, 孙亮, 赵国林, 等. 褪黑素诱导西伯利亚百合的转录组分析及 *LoERF96* 基因克隆[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2024, 39(4): 119–130. DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).202401006](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).202401006)

褪黑素诱导西伯利亚百合的转录组分析及 *LoERF96* 基因克隆*

刘 烨¹, 孙 亮², 赵国林¹, 彭梦群¹, 贾文杰³, 李 想³, 张小平¹, 王有国^{1**}

(1. 云南农业大学 园林园艺学院, 云南 昆明 650201;

2. 金华职业技术大学 农学院, 浙江 金华 321017;

3. 云南省农业科学院 花卉研究所, 云南 昆明 650205)

摘要:【目的】研究西伯利亚百合萌发阶段的分子调控机制, 筛选响应褪黑素、促进百合鳞茎萌发的潜在乙烯响应因子(ethylene response factor, ERF)。【方法】对褪黑素处理下的西伯利亚百合小鳞茎关键时期样本进行转录组测序分析, 并对差异表达基因进行功能注释, 筛选响应褪黑素、促进百合鳞茎萌发的 ERF 潜在基因。对筛选的关键基因 *LoERF96* 进行克隆和生物信息学分析, 通过实时荧光定量分析小鳞茎 4 个不同生长发育时期中 *LoERF96* 基因的表达量。【结果】根据转录组数据筛选得到 780 个差异表达基因, 其中上调表达基因 392 个, 下调表达基因 388 个。GO 富集分析结果显示: 富集的差异基因主要生物学过程包括代谢过程、细胞过程、生物调节、刺激响应、信号、生殖过程等。KEGG 代谢途径分析结果显示: 差异基因的代谢途径包括植物激素信号转导、植物 MAPK 信号途径、苯丙烷生物合成、淀粉和蔗糖代谢、光合作用、碳代谢、内质网中的蛋白质加工等。通过同源克隆得到 *LoERF96* 基因, 该基因序列全长 435 bp, 编码 144 个氨基酸, 有 1 个 AP2 保守结构域, 蛋白相对分子质量约为 16.32 ku, 理论等电点为 4.94, 是没有跨膜结构的亲水性蛋白, 预测亚细胞定位于细胞核中。RT-qPCR 表达结果显示: 在百合 4 个不同生长发育过程中, *LoERF96* 基因的相对表达量总体呈先上升后下降的趋势。【结论】西伯利亚百合中的乙烯响应因子 *LoERF96* 受褪黑素诱导表达, 这一结果为探究百合 AP2/ERF 转录因子萌发阶段的生物学功能提供了理论基础和参考。

关键词: 百合; *LoERF96*; 基因克隆; 转录组; 生物信息学分析

中图分类号: S682.265.01

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X(2024)04-0119-12

Transcriptome Analysis of *Lilium* Siberian Induced by Melatonin and *LoERF96* Gene Cloning

LIU Ye¹, SUN Liang², ZHAO Guolin¹, PENG Mengqun¹, JIA Wenjie³,

LI Xiang³, ZHANG Xiaoping¹, WANG Youguo¹

(1. College of Horticulture and Landscape, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. School of Agriculture, Jinhua University of Vocational Technology, Jinhua 321017, China;

3. Flower Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China)

Abstract: [Purpose] To study the molecular regulatory mechanism of the germination stage of *Lilium* Siberian, and to screen the potential ethylene response factor (ERF) that responds to melatonin

收稿日期: 2024-01-06

修回日期: 2024-06-30

网络首发日期: 2024-09-09

*基金项目: 国家自然科学基金项目(32060690)。

作者简介: 刘烨(1998—), 男, 安徽淮南人, 在读硕士研究生, 主要从事园林植物与观赏园艺研究。

E-mail: 1683460035@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 王有国(1970—), 男, 甘肃山丹人, 博士, 教授, 主要从事园林植物与观赏园艺研究。E-mail: wyg9988@sohu.com

网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/53.1044.S.20240909.1203.002>



to promote the germination of *Lilium* Siberian. [Methods] Transcriptome sequencing analysis was performed on the samples of *Lilium* Siberian bulblets under melatonin treatment during the critical period, and the differentially expressed genes were functionally annotated, screening the potential ERF genes that respond to melatonin to promote the germination of lily bulblets. The screened key gene *LoERF96* was cloned and bioinformatically analyzed, and the expression of *LoERF96* gene was quantified by RT-qPCR in four different growth and development periods of small bulbs.

[Results] According to the transcriptome data, 780 differential expressed genes were obtained, including 392 up-regulated genes and 388 down-regulated genes. The results of GO enrichment analysis showed that: the biological processes of enriched differential genes included metabolic processes, cellular processes, biological regulation, stimulus response, signaling, reproductive process, and so on. KEGG metabolic pathway analysis showed that: the metabolic pathways of the differential genes included plant hormone signal transduction, plant MAPK signaling pathway, phenylpropanoid biosynthesis, starch and sucrose metabolism, photosynthesis, carbon metabolism, protein processing in endoplasmic reticulum, and so on. The *LoERF96* gene was obtained by homologous cloning, the full-length sequence of the gene was 435 bp, encoding 144 amino acids, with one AP2 conserved structural domain, the relative molecular weight of the protein was about 16.32 ku, and the theoretical isoelectric point was 4.94; it was a hydrophilic protein with no transmembrane structure, and the subcellular localization was predicted to be in nucleus. RT-qPCR results showed that: in the four different growth and development periods of lily, the relative expression level of *LoERF96* gene showed a general trend of first increase and then decrease. [Conclusion] The expression of ethylene response factor *LoERF96* in *Lilium* Siberian is regulated by melatonin, which provides a theoretical basis and reference for exploring the biological functions of the lily AP2/ERF transcription factor during the germination phase.

Keywords: lily (*Lilium* spp.); *LoERF96*; gene cloning; transcriptome; bioinformatics analysis

百合 (*Lilium* spp.) 是百合科 (Liliaceae) 百合属 (*Lilium*) 所有种类的总称, 通常为具有根状茎、块茎或鳞茎的多年生草本。西伯利亚百合 (*Lilium* 'Siberia') 属于东方百合, 由天香百合 (*L. auratum* Lindl.)、药百合 (*L. speciosum* var. *gloriosoides* Baker) 等品种杂交而成, 由于其花大而美丽, 开放时气味芳香, 是非常受消费者欢迎的鲜切花之一^[1]。切花的生产需要优质的商品种球, 鳞片繁殖成本低、操作简便、繁殖系数高, 是目前种球商品化生产最常用的技术途径^[2]。百合种球从鳞片扦插到成球的生产周期较长, 小鳞茎培养成合格的种球一般需要 2~3 年, 如何提高小鳞茎的繁殖系数、促进鳞茎膨大对百合种球的生产至关重要。因此, 研究促进百合小鳞茎萌发的分子机制及挖掘调控萌发的潜在基因具有重要意义。

AP2/ERF 转录因子是植物中的一大类因子, 该家族参与多种生物学过程, 包括植物形态建成、病菌防御、对各种胁迫的响应机制、激素信

号转导等^[3]。AP2/ERF 家族转录因子主要分为脱水反应元件结合蛋白 (dehydration-responsive element binding protein, DREB)、乙烯响应因子 (ethylene response factor, ERF)、APETALA2 (AP2) 和 ABI3/VP1 相关因子 (related to ABI3/VP1, RAV) 四大亚家族以及少数未分类因子 (Soloists)^[4]。ERF 亚家族不仅参与植物发育和生理过程的多种功能, 还参与种子萌发和芽休眠。*SlPTi4* 是番茄 (*Solanum lycopersicum* L.) 果实成熟、种子萌发和非生物胁迫响应的重要调节因子^[5]; 油桃 (*Prunus persica* var. *nectarina*) 中的 ERF 家族成员 *PpeEBB1* 可调控桃芽萌发^[6]; 在砧山酥梨中, *PpyERF060*、*PpyABF3* 和 *PpyMADS71* 互作可整合乙烯与脱落酸的信号通路, 进而调控梨芽休眠进程^[7]; 樱桃 (*Prunus pseudocerasus*) 中的 *PpcERF5* 表达被脱落酸 (abscisic acid, ABA) 诱导上调, 这可能是其参与樱桃花芽休眠调控的方式之一, 过表达 *PpcERF5* 基因还可提高转基因拟南芥 (*Arabidopsis*

thaliana) 种子的萌发率^[8]。

褪黑素在调节植物生长、种子发芽、叶片衰老、光合效率、果实成熟等生理生长过程以及调控植物增强抗逆性、抵御细菌和真菌病害方面具有重要作用^[9-11]。褪黑素是与植物激素相关的基因表达的重要调节剂, 它与植物激素之间表现出复杂的交叉作用, 如参与生长素、吲哚乙酸、赤霉素、细胞分裂素、脱落酸、乙烯、水杨酸、茉莉酮、油菜素类固醇的代谢^[12-14]。拟南芥中的褪黑素可通过降低 *IAA17* 及衰老相关基因的表达抑制植物的衰老进程^[15]; 褪黑素处理可以通过影响氨基酸代谢来提高冷藏果实的可溶性糖含量、香气水平和果实品质^[16]; 番茄中低浓度的外源褪黑素处理可以促进不定根的形成^[17]; 相反, 高浓度的褪黑素处理会抑制生长素的生物合成以及转运途径中许多基因的表达^[18]; 用褪黑素处理多年生黑麦草 (*Lolium perenne* L.), 增加了热应激下褪黑素的内源含量, 从而降低 ABA 含量^[19]; 外源褪黑素可促进 *Cr* 胁迫下百日草 (*Zinnia elegans*) 的种子萌发, 提高其对 *Cr* 胁迫的抗性^[20]; 在黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 幼苗中, 褪黑素通过调节 ABA 和赤霉素 (gibberellin, GA_4) 的生物合成和分解代谢以减轻 NaCl 的胁迫抑制作用, 促进发芽^[21]。

百合萌发的相关作用机制很复杂, 高通量转录组测序技术为探究萌发分子机制提供了途径和方法, 可用于系统研究百合萌发过程的相关代谢通路。AP2/ERF 转录因子在植物生长发育、代谢、生物和非生物胁迫方面扮演着重要角色, 而关于促进百合鳞茎萌发的报道较少。为深入研究百合萌发阶段的分子调控机制, 通过对褪黑素处理下的百合小鳞茎进行转录组测序分析, 并对差异表达的基因进行功能注释, 筛选受褪黑素诱导的 *LoERF96* 基因; 对该基因进行克隆及生物信息学分析, 利用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 分析其小鳞茎 4 个不同生长发育时期的基因表达量, 为探究百合 AP2/ERF 转录因子在萌发过程中的生物学功能提供理论基础和参考。

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试百合小鳞茎由西伯利亚百合大种球 (云南沃德球根生物科技有限公司) 鳞片包埋繁殖获

得。将西伯利亚百合大种球中外层的鳞片剥下, 包埋于椰糠基质中, 在 28 °C 恒温培养箱中遮光培养 45 d, 然后将获得的小鳞茎置于 4 °C 环境中低温冷藏 70 d, 冷藏结束后将小鳞茎洗净、晾干待用。

1.2 样本处理

选取生长状态良好、大小一致、鲜质量为 (0.20 ± 0.10) g 的百合小鳞茎, 随机平均分为 2 组, 每组 72 个 (含 3 次重复), 其中一组为处理组, 用 100 μ mol/L 褪黑素溶液浸泡 2 h; 另一组为对照组, 用蒸馏水浸泡 2 h。将浸泡处理后的小鳞茎放在滤纸上晾干, 将小鳞茎栽培到椰糠为基质的营养钵中, 每个营养钵栽培 3 个; 将营养钵放入 25 °C 的光照恒温培养箱中培养, 小鳞茎破土长出芽即认为萌发, 分别在第 0、7、14 和 21 天取样, 液氮速冻后置于 -80 °C 超低温冰箱保存, 用于后续试验。

1.3 总 RNA 提取

按照 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司, DP441) 说明书, 分别提取 4 个不同时期处理组和对照组的西伯利亚百合小鳞茎总 RNA, 用 NanoDrop 2000 分光光度计检测 RNA 的纯度和浓度, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量; 检测合格后, 取部分试验第 21 天的 RNA 进行转录组测序及目的基因克隆试验; 4 个时期的全部 RNA 材料均用于后续的基因表达分析。

1.4 转录组测序

RNA 检测合格后进行转录组文库构建, 用含有 Oligo (dT) 的磁珠富集真核生物 mRNA 将 mRNA 随机打断, 以 mRNA 为模板合成 cDNA 第 1 链和第 2 链并进行 cDNA 纯化, 然后进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头, PCR 富集得到 cDNA 文库。用 N50 数值对组装文库进行质量评估检测, Unigene N50 越长, 说明组装质量越好。N50 的定义为: 将所有 Unigene 从长到短排序, 并依次累加长度, 当累加片段长度达到总片段长度的 50% 时, 对应的片段长度即为 N50。文库质检合格后, 用 Illumina NovaSeq6000 测序平台进行测序 (委托北京百迈客生物科技有限公司完成)。

1.5 Unigene 功能注释

将 Unigene 序列与非冗余蛋白质序列 (non-redundant protein sequence, NR) 数据库、Swiss-Prot 蛋白质序列 (Swiss-Prot protein sequence, Swi-

ss-Prot) 数据库、原核生物同源蛋白簇 (clusters of orthologous groups, COG)、真核生物同源蛋白簇 (eukaryotic orthologous groups, KOG)、eggNOG4.5 数据库、Pfam 数据库 (protein family, <http://pfam.sanger.ac.uk/>)、京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 和 (geneontology, GO, <http://www.geneontology.org/>) 数据库比对, 获得 Unigene 的注释信息。

1.6 差异基因的筛选

将差异倍数 $|\log_2FC| \geq 2$ 和 $P < 0.01$ 作为标准筛选差异表达基因, 使用 DESeq2 软件进行差异分析。

1.7 LoERF96 序列克隆

将褪黑素诱导 21 d 的百合小鳞茎总 RNA 用 All-In-One 5× RT MasterMix (abm, G592) 逆转录为 cDNA, 基于转录组数据获得差异基因 LoERF96 的序列, 用 Premier 6.0 设计扩增全长序列

的特异性引物 (表 1), 委托擎科生物科技股份有限公司昆明分公司进行引物合成, 然后进行 LoERF96 基因的 cDNA 扩增。PCR 总反应体系为 25.0 μL , 包括 2×T5 Super PCR Mix (Basic) 12.5 μL , 正、反向引物各 1.0 μL , cDNA 模板 1.0 μL , ddH₂O 9.5 μL 。PCR 反应程序为: 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 63 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s, 共 35 个循环, 循环结束后 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 2 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 对扩增得到的目的片段进行切胶, 再使用 DNA 凝胶回收试剂盒 (擎科生物科技股份有限公司, TSP602-200) 进行胶回收和纯化; 将目的片段与 pClone007-T 载体连接, 并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 涂到含 Amp 抗生素的 LB 培养基平板后, 倒置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱过夜培养; 次日挑取单菌落并对菌液进行 PCR 验证, 将阳性克隆菌液送至擎科生物科技股份有限公司测序。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequence

基因名称 gene name	正向引物序列 (5'→3') forward primer sequence	反向引物序列 (5'→3') reverse primer sequence	用途 usage
LoERF96	ATGCACCAGCTCATGGAAGGAAGC	TTATTGTCCCTGTCGTCGCTCTCCT	基因克隆 gene cloning
LoERF96	GGAGCCCAAACACCAACCCAA	AAGTGCCGAGCCAGACACGTA	荧光定量PCR real-time PCR
ERF105	CAGTTCTAGCACCTGCCTCCCT	GTATCGCTCTGGCGTCCGTATCT	
CDC5	CCGTCTCAAAGGACACCCTACCA	TGTGGAGTGGGAGTGTGAAGAGG	
MYB36	CTGCCGTTGCCGAAGATGAACT	CACCTCCACCACCACTACCAGAA	
WRKY28	TGCGATGGCAACATCTGCATCT	ATGCGGGCATTGCAGGAATTGA	
WOX8	TGGCTCCGAACACCTTGTGGA	GCTCCTCGAACTTCCCTTGTGC	
LOB30	GCTCTCATCTCCGCCGAAACAC	TCATCGTGCTCGCTCTGTTCT	
LoFP	TCGCCTACATCGCTAACCC	TTCCCAATAATCGCAAGACC	荧光定量内参 reference gene of real-time

1.8 RT-qPCR 验证转录组及不同时期 LoERF96 的表达分析

为了验证转录组测序结果的准确性, 随机挑选 CDC5、LOB30、LoERF105、MYB36、WOX8 和 WRKY28 共 6 个差异基因进行 RT-qPCR 验证。用 Premier 6.0 设计 RT-qPCR 基因特异性引物 (表 1), 按照 BlasTaq™ 2× qPCR MasterMix (abm, G891) 试剂盒说明书, 在 Applied Biosystems QuantStudio 5 实时荧光定量 PCR 仪上进行实时荧光检测, 选择百合 F-box 家族蛋白 LoFP 基因作为内参基因^[22]。RT-qPCR 反应体系为 20.0 μL , 包括 BlasTaq™ 2× qPCR MasterMix 10.0 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$

正、反向引物各 0.5 μL , cDNA 1.0 μL 和 ddH₂O 8.0 μL 。RT-qPCR 扩增程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 40 个循环。每个样品设置 3 次生物学重复。采用 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 法计算基因相对表达量; 采用 Excel 统计数据; 采用 Origin 2021 绘制图表; 采用 SPSS 26 进行显著性分析。

1.9 LoERF96 的生物信息分析

使用 Expasy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析 LoERF96 蛋白的序列长度、分子质量、等电点、不稳定指数、脂溶性指数、亲水性等理化性质; 使用 DeepTMHMM (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>) 解析蛋白跨膜区域; 使用 NCBI

中 CD-Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 工具预测氨基酸序列的保守结构域; 使用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) 预测蛋白质的二级结构; 使用 SWISS-MODE 预测蛋白质的三级结构 (<https://swissmodel.expasy.org/>); 使用 Plant-mPLOC (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) 在线分析工具预测蛋白质的亚细胞定位。使用 NCBI 数据库中的 Protein Blast 工具寻找 *LoERF96* 蛋白氨基酸的同源序列; 使用 MEGA 11.0 进行多序列比对, 并采用邻接

法构建系统进化树, Bootstraps 设置重复 1000 次。

2 结果与分析

2.1 序列的组装和质量控制

完成 6 个样品的转录组测序, 获得的有效数据总量为 38.95 Gb, 各样品的有效数据量均达到 6.03 Gb, GC 碱基含量为 50.51%, Q30 碱基的百分比大于 87.88%。组装共获得 132 750 个转录本和 78 100 条 Unigene, 其中长度大于 1 kb 的 Unigene 有 20 431 条, Unigene 的 N50 为 1 355 bp, 表明组装的完整性较高 (表 2)。

表 2 转录本和 Unigene 序列的长度分布
Tab. 2 Length distribution of transcripts and Unigenes

序列长度/bp sequence length	转录本 transcripts		Unigenes	
	数量 number	比例/% percentage	数量 number	比例/% percentage
>200~300	18 515	13.95	15 442	19.77
>300~500	34 749	26.18	23 329	29.87
>500~1 000	35 451	26.70	18 898	24.20
>1 000~2 000	28 747	21.65	13 313	17.05
>2 000	15 288	11.52	7 118	9.11
总数量 total number	132 750		78 100	
总长度/bp total length	131 646 756		66 907 113	
N50长度/bp N50 length	1 512		1 355	
平均长度/bp mean length	991.69		856.69	

2.2 Unigene 功能注释统计

在 NR、Swiss-Prot、COG、KOG、eggNOG4.5、Pfam、KEGG 和 GO 共 8 个数据库获得 42 458 条 Unigene 的注释结果, 每个数据库注释到的基因数量分别为 40 403、21 492、10 357、21 880、29 112、26 857、24 294 和 31 149。

2.3 差异基因的筛选结果

对褪黑素处理组 and 对照组的转录组数据进行差异表达分析, 得到 780 个差异表达基因, 其中上调表达基因 392 个, 下调表达基因 388 个 (图 1)。

2.4 差异表达基因的 GO 分类富集分析和代谢通路 KEGG 富集分析

所有差异表达基因的 GO 富集分析结果 (图 2) 显示: 在生物过程中富集到差异表达基因主要包括代谢过程、细胞过程、生物调节、刺激响应、信号、生殖过程等; 在细胞组分中富集到差异基因功能主要包括细胞、细胞器、膜、大分子复合物等; 在分子功能中富集到差异基因功能主要包括结合活性、催化活性、转运活性、核酸结合转

录因子活性、分子功能调节等。

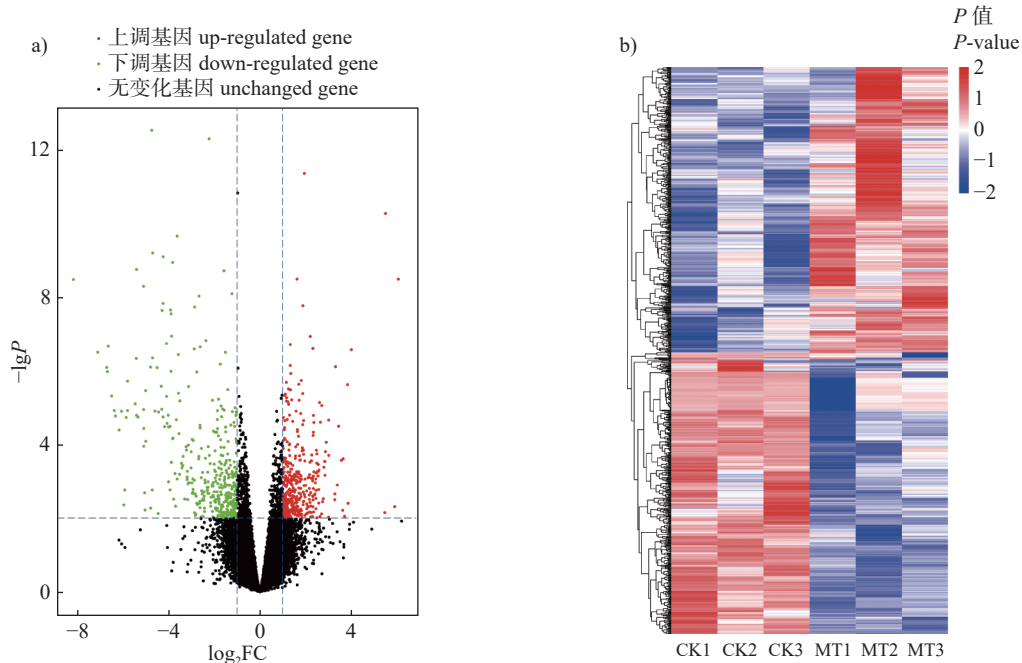
对差异表达基因进行 KEGG 代谢通路的富集分析, 筛选出显著富集的代谢途径 50 条, 主要包括植物激素信号转导、植物 MAPK 信号途径、核糖体、苯丙烷生物合成、淀粉和蔗糖代谢、光合作用、碳代谢、内质网中的蛋白质加工、植物病原菌互作等 (图 3)。

2.5 小鳞茎萌发相关基因 *LoERF96* 的克隆及测序结果

根据转录组数据分析结果, 筛选出 1 个褪黑素诱导后显著上调表达的 ERF 转录因子, 以西伯利亚百合小鳞茎 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增得到 *ERF* 基因的 cDNA 全长, 1% 的琼脂糖凝胶电泳显示在 250~500 bp 之间有 1 条清晰的条带 (图 4a), 命名为 *LoERF96*, 切胶回收后测序并与转录组数据的基因序列比对一致, 全长为 435 bp, 编码 144 个氨基酸 (图 4b)。

2.6 *LoERF96* 编码蛋白的生物信息学分析

LoERF96 蛋白相对分子质量约为 16.32 ku, 理



注：图 a) 中，FC 为差异倍数；图 b) 中，CK1、CK2 和 CK3 为蒸馏水对照组的 3 个重复，MT1、MT2 和 MT3 为褪黑素处理组的 3 个重复。

Note: In Fig. a), FC indicates fold change; in Fig. b), CK1, CK2, and CK3 are three repeats of the distilled water control group; MT1, MT2, and MT3 are three repeats of the melatonin treated group.

图 1 差异表达基因火山图 (a) 和聚类热图 (b)

Fig. 1 Volcano map and cluster heatmap of differentially expressed genes

论等电点为 4.94，分子式为 $C_{692}H_{1078}N_{218}O_{232}S_5$ ，共含有 2225 个原子。该蛋白由 20 种不同的氨基酸组成，以精氨酸的含量最高，占总量的 12.5%；半胱氨酸、组氨酸和赖氨酸的含量最低，分别占总量的 1.4%。LoERF96 蛋白有 27 个带负电荷的残基 (Asp+Glu) 和 20 个带正电荷的残基 (Arg+Lys)，不稳定系数为 70.95，表明该蛋白属于不稳定蛋白；脂肪系数为 53.61；亲水性系数为 -1.026，表明该蛋白为亲水性蛋白。预测 LoERF96 蛋白不存在跨膜区，不属于跨膜蛋白 (图 4c)。LoERF96 基因结构域分析结果 (图 4d) 显示：其在氨基酸 40 和 103 之间有 1 个 AP2 保守结构域，是典型的 AP2/ERF 家族成员，属于 ERF 亚家族，其亚细胞定位于细胞核。

由 LoERF96 蛋白的二级结构 (图 4e) 可知：该蛋白编码的 144 个氨基酸中有 4 种二级结构，其中， α -螺旋占 31.94%， β -折叠占 4.17%，无规则卷曲占 52.08%，延伸链占 11.81%，蛋白质以无规则卷曲为主，说明其结构不稳定。以含有 1 个 AP2 结构域的 A0A0D6RAM1_ARACU (A0A0D6RAM1.1.A) 基因为模型预测 LoERF96 蛋白质

的三级结构，其覆盖率为 56.00%，序列相似性为 70.37%，以无规则卷曲和 α -螺旋为主 (图 4f)，符合二级结构预测结果。

2.7 LoERF96 蛋白的同源性与系统进化树分析

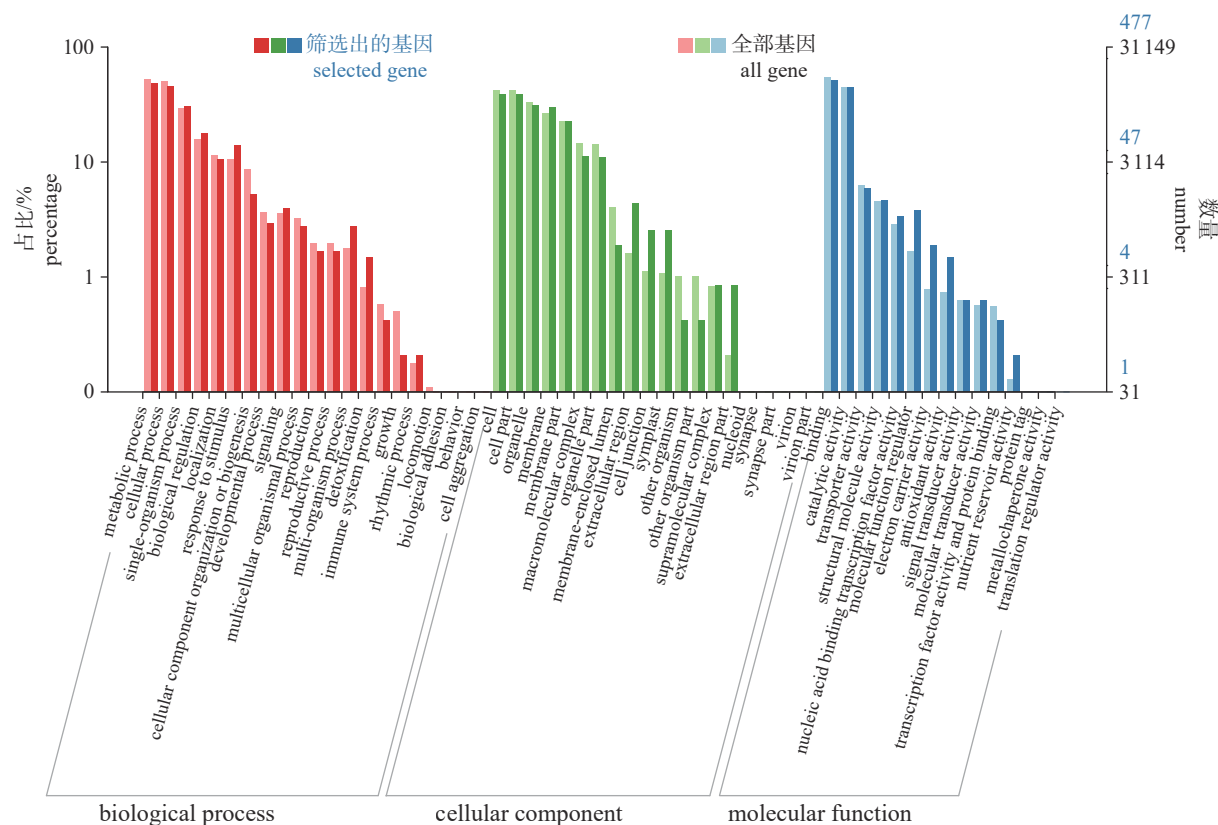
进化树分析结果 (图 5) 表明：LoERF96 氨基酸序列与番茄 (*Solanum lycopersicum* A0A3Q7I5-Y9.1)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* Q8VY90.1)、烟草 (*Nicotiana tabacum* Q40478.1)、蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula* A9Y0K9.1)、喜马拉雅凤仙花 (*Impatiens glandulifera* XP_047312446.1) 等物种的同源性较高。

2.8 LoERF96 在小鳞茎不同生长发育时期的表达

由图 6 可知：褪黑素处理后，LoERF96 的相对表达量总体呈先上升后下降的趋势。第 7 天时，该基因的表达量比对照组高 2.08 倍；第 14 天时，其表达量较对照组极显著高 10.06 倍，第 21 天时，其表达量比对照组高 2.94 倍。可见，LoERF96 基因受褪黑素诱导表达，且可以快速响应并表达。

2.9 RT-qPCR 验证转录组数据

6 个差异表达基因的 RT-qPCR 试验结果如



注/Note: 生物过程 (biological process): 代谢过程 (metabolic process)、细胞过程 (cellular process)、单体过程 (single-organism process)、生物调节 (biological regulation)、定位 (localization)、刺激响应 (response to stimulus)、细胞成分组织或生物发生 (cellular component organization or biogenesis)、发育过程 (developmental process)、信号 (signaling)、多细胞生物过程 (multicellular organismal process)、生殖 (reproduction)、生殖过程 (reproductive process)、多有机体过程 (multi-organism process)、解毒 (detoxification)、免疫系统过程 (immune system process)、生长 (growth)、节律过程 (rhythmic process)、移动 (locomotion)、生物黏附 (biological adhesion)、行为 (behavior)、细胞聚集 (cell aggregation)。细胞组分 (cellular component): 细胞 (cell)、细胞部分 (cell part)、细胞器 (organelle)、膜 (membrane)、膜部分 (membrane part)、大分子复合物 (macromolecular complex)、细胞器部分 (organelle part)、膜腔 (membrane-enclosed lumen)、细胞外区域 (extracellular region)、细胞连接 (cell junction)、合胞体 (symplast)、其他生物体 (other organism)、其他生物体部分 (other organism part)、超分子复合物 (supramolecular complex)、胞外区部分 (extracellular region part)、类核物质 (nucleoid)、突触 (synapse)、突触部分 (synapse part)、病毒粒子 (virion)、病毒粒子部分 (virion part)。分子功能 (molecular function): 结合活性 (binding)、催化活性 (catalytic activity)、转运活性 (transporter activity)、结构分子活性 (structural molecule activity)、核酸结合转录因子活性 (nucleic acid binding transcription factor activity)、分子功能调节 (molecular function regulator)、电子载体活性 (electron carrier activity)、抗氧化活性 (antioxidant activity)、信号转活性 (signal transducer activity)、分子转活性 (molecular transducer activity)、转录因子活性和蛋白质结合 (transcription factor activity and protein binding)、营养活性 (nutrient reservoir activity)、蛋白质标签 (protein tag)、金属伴侣活性 (metallochaperone activity)、翻译调节因子活性 (translation regulator activity)。

图 2 差异表达基因的 GO 富集图

Fig. 2 GO enrichment map of differentially expressed genes

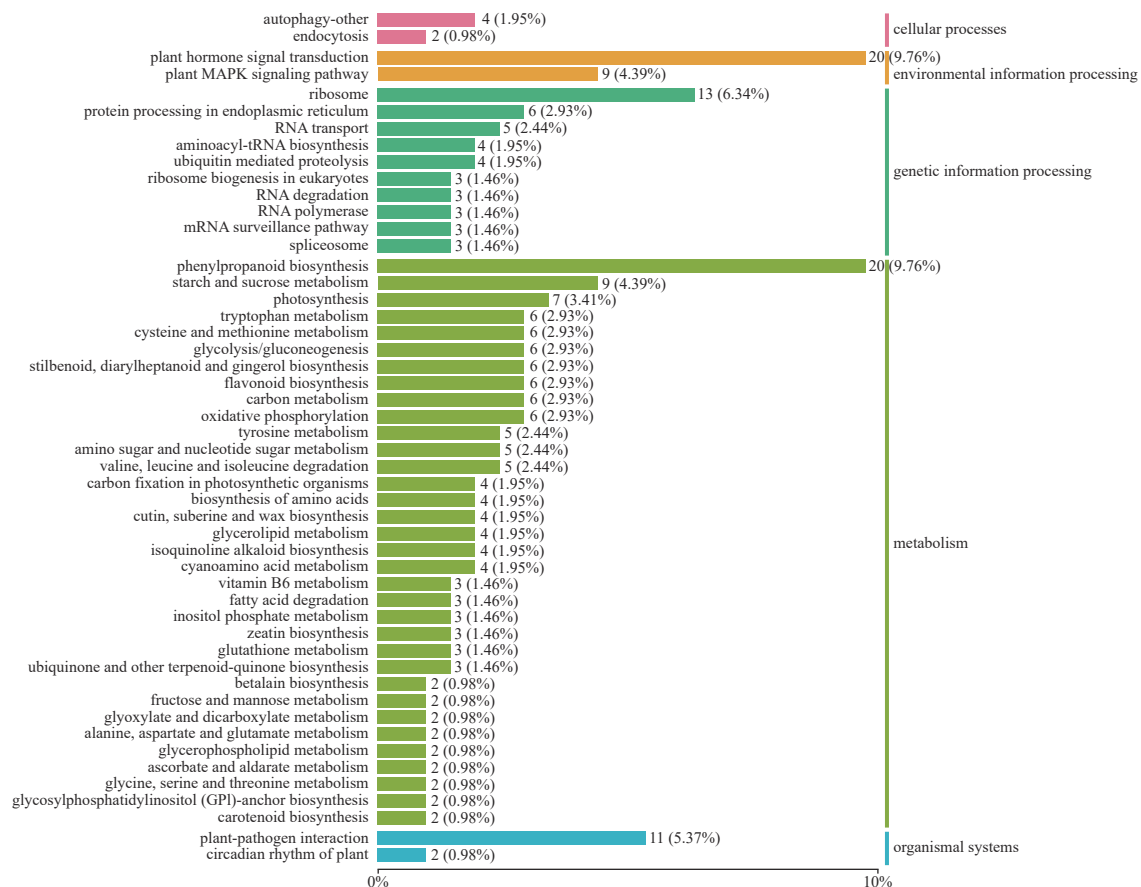
图 7 所示。RT-qPCR 结果和第 21 天转录组数据 (表 3) 的基因表达趋势完全一致, 表明转录组测序获得的数据比较准确。

3 讨论

本研究对外源褪黑素处理下西伯利亚百合小鳞茎生长发育时期的转录组数据进行分析, KEGG 富集分析结果显示: 差异表达基因显著富集在包括植物激素信号转导、植物 MAPK 信号途径、核糖体、苯丙烷生物合成、淀粉和蔗糖代谢、光合作用、碳代谢、内质网中的蛋白质加

工、植物病原菌互作等途径。植物激素代谢和信号转导途径中的不同激素可以单独或相互调控发挥作用, 调控植物生长发育、开花结果、衰老等过程^[23]。褪黑素与大多数植物激素的变化有关, 它在植物生命周期的每个发育阶段起关键作用, 大量研究表明: 植物内源激素水平与休眠解除和萌发密切相关, 但其在百合萌发过程中的调控机制尚不明确。

通过筛选褪黑素处理下的西伯利亚百合转录组数据, 从小鳞茎中成功克隆出可能与萌发有关的乙烯响应因子 *LoERF96* 基因, 其 cDNA 全长为 435 bp,



注/Note: 细胞过程 (cellular processes): 自噬其他 (autophagy-other), 内分泌 (endocytosis)。环境信息加工 (environmental information processing): 植物激素信号转导 (plant hormone signal transduction), 植物 MAPK 信号途径 (plant MAPK signaling pathway)。遗传信息加工 (genetic information processing): 核糖体 (ribosome), 内质网中的蛋白质加工 (protein processing in endoplasmic reticulum), RNA 转运 (RNA transport), 氨酰基 tRNA 生物合成 (aminoacyl-tRNA biosynthesis), 泛素介导的蛋白水解 (ubiquitin mediated proteolysis), 真核生物核糖体的生物发生 (ribosome biogenesis in eukaryotes), RNA 降解 (RNA degradation), RNA 聚合酶 (RNA polymerase), mRNA 监测途径 (mRNA surveillance pathway), 剪接体 (spliceosome)。代谢 (metabolism): 苯丙烷生物合成 (phenylpropanoid biosynthesis), 淀粉和蔗糖代谢 (starch and sucrose metabolism), 光合作用 (photosynthesis), 色氨酸代谢 (tryptophan metabolism), 半胱氨酸和蛋氨酸代谢 (cysteine and methionine metabolism), 糖酵解/糖异生 (glycolysis/gluconeogenesis), 二苯乙烯、二芳基庚烷和姜酚的生物合成 (stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis), 类黄酮生物合成 (flavonoid biosynthesis), 碳代谢 (carbon metabolism), 氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation), 酪氨酸代谢 (tyrosine metabolism), 氨基糖和核苷酸糖代谢 (amino sugar and nucleotide sugar metabolism), 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解 (valine, leucine and isoleucine degradation), 光合生物固碳作用 (carbon fixation in photosynthetic organisms), 氨基酸的生物合成 (biosynthesis of amino acids), 角质、木栓和蜡的生物合成 (cutin, suberine and wax biosynthesis), 甘油酯代谢 (glycerolipid metabolism), 异喹啉生物碱生物合成 (isoquinoline alkaloid biosynthesis), 氰基氨基酸代谢 (cyanoamino acid metabolism), 维生素 B6 代谢 (vitamin B6 metabolism), 脂肪酸降解 (fatty acid degradation), 肌醇磷酸代谢 (inositol phosphate metabolism), 玉米素生物合成 (zeatin biosynthesis), 谷胱甘肽代谢 (glutathione metabolism), 泛醌和其他萜类醌生物合成 (ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis), 甜菜碱的生物合成 (betalain biosynthesis), 果糖和甘露糖代谢 (fructose and mannose metabolism), 乙醛酸和二羧酸代谢 (glyoxylate and dicarboxylate metabolism), 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 (alanine, aspartate and glutamate metabolism), 甘油磷脂代谢 (glycerophospholipid metabolism), 抗坏血酸和阿糖二酸代谢 (ascorbate and aldarate metabolism), 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 (glycine, serine and threonine metabolism), 糖基磷脂酰肌醇 (GPI)-锚生物合成 [glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor biosynthesis], 类胡萝卜素生物合成 (carotenoid biosynthesis)。生物系统 (organismal systems): 植物病原菌互作 (plant-pathogen interaction), 植物昼夜节律 (circadian rhythm of plant)。

图 3 差异表达基因的 KEGG 代谢通路富集

Fig. 3 Enrichment of KEGG metabolic pathway of differentially expressed genes

编码 144 个氨基酸。对其蛋白理化性质进行分析, 推测该蛋白属于不稳定的亲水性蛋白, 且无跨膜结构; 其含有 1 个 AP2 保守结构域, 是典型的 AP2/ERF 家族成员, 这与芒果 (*Mangifera indica* L.) 的 *MiERF2* 基因也只存在单一 AP2 结构域^[24]的研究结果一致。蛋白二级结构预测结果显示: LoERF96 蛋白以无规则卷曲和 α -螺旋为主,

β -折叠和延伸链占比最少, 无规则卷曲为主说明其蛋白质结构不稳定, 这与苦荞 [*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn]^[25]*FtERF* 基因以及木薯 (*Manihot esculenta* Crantz)^[26]*MeERF5* 基因的编码蛋白结构类似, 也符合 LoERF96 蛋白的三级结构预测结果。亚细胞定位预测 *LoERF96* 基因位于细胞核, 氨基酸多序列同源比对发现 LoERF96 蛋白

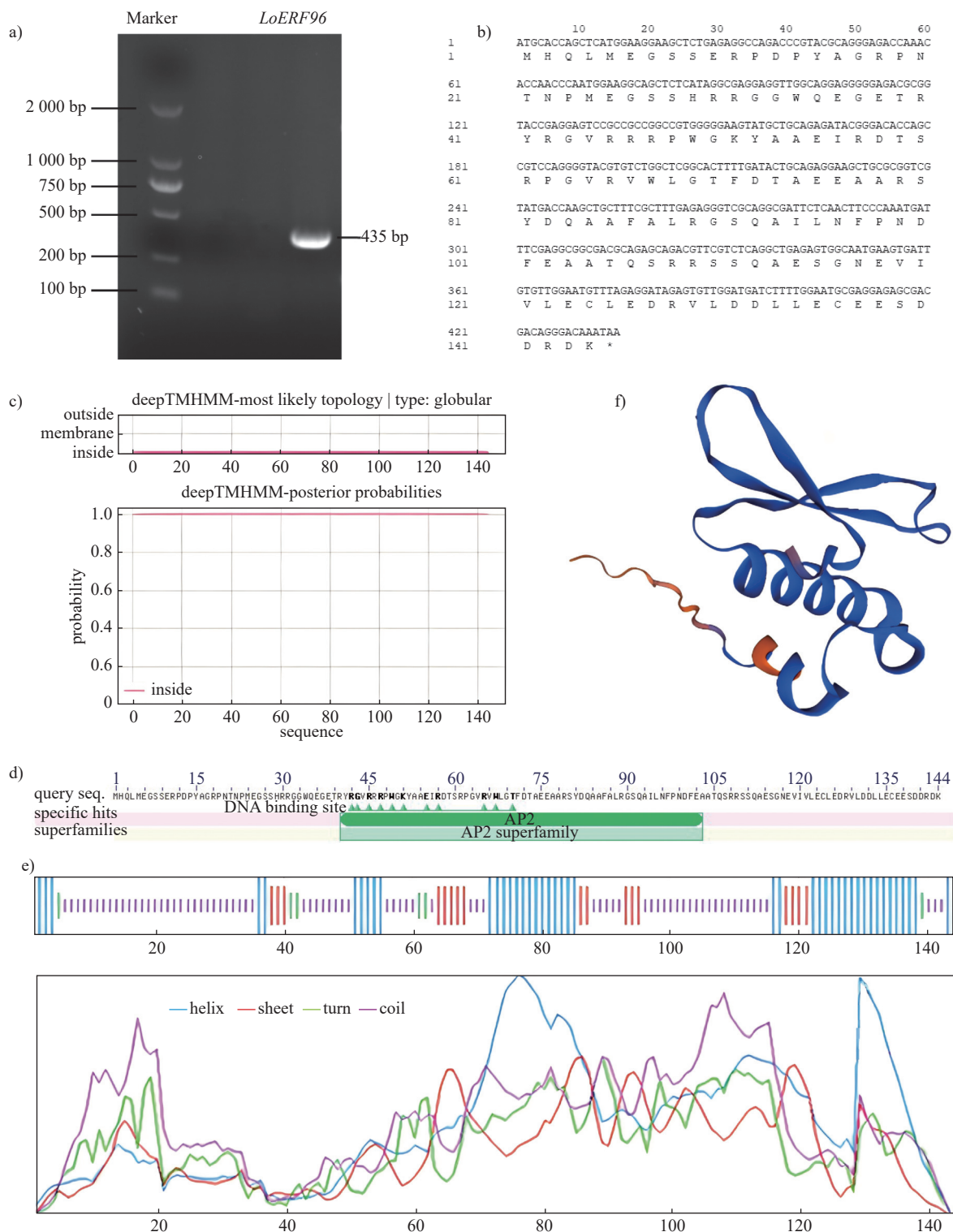


图4 *LoERF96* 的克隆 (a)、氨基酸序列 (b)、蛋白跨膜结构 (c)、基因结构域 (d) 以及蛋白的二级结构 (e) 和三级结构 (f)
Fig. 4 Cloning of *LoERF96* (a), amino acid sequence (b), protein transmembrane structure (c), gene domain (d), and the secondary structure (e) and tertiary structure (f) of protein

与番茄、拟南芥、烟草、蒺藜苜蓿、喜马拉雅凤仙花等物种的同源性较高。相关研究表明: 小乙烯响应因子 *ERF96* 参与拟南芥 ABA 反应的调

控, 是 ABA 反应的正调节因子^[27]。因此, 推测 *Lo-ERF96* 在百合中也具有类似的功能。

褪黑素主要参与植物发芽、生长、根茎生

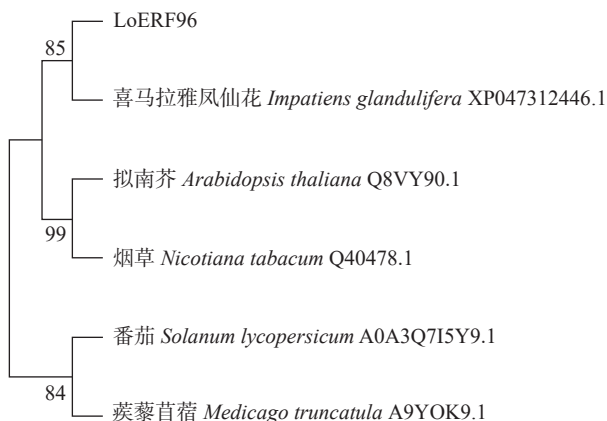
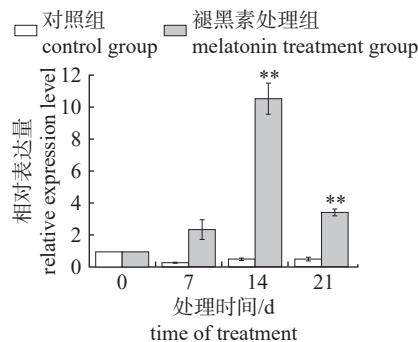


图 5 基于 LoERF96 氨基酸序列构建的系统进化树
Fig. 5 Constructing a phylogenetic tree based on LoERF96 amino acid sequence

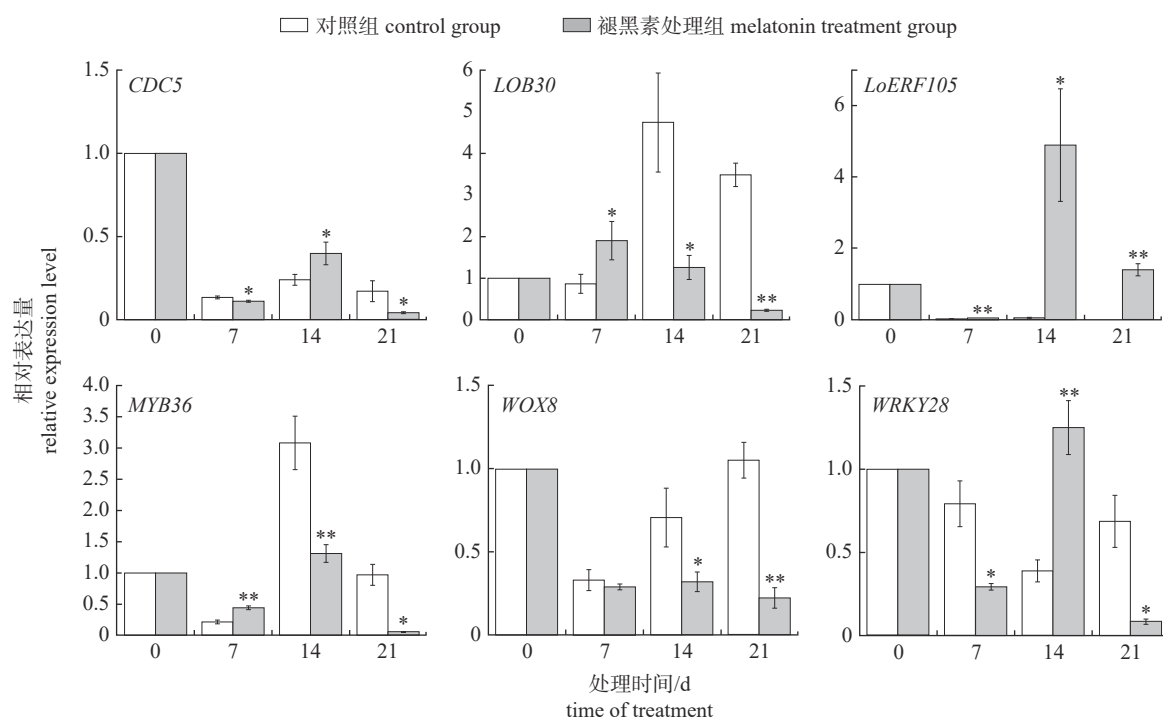


注: “***”表示差异极显著 ($P < 0.01$); 下同。

Note: “***” indicates extremely significant differences ($P < 0.01$); the same as below.

图 6 不同生长时期小鳞茎的 LoERF96 相对表达量

Fig. 6 Relative expression levels of LoERF96 in small bulbs at different growth stages



注: “*”表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: “*” indicates significant differences ($P < 0.05$).

图 7 RT-qPCR 验证转录组数据

Fig. 7 RT-qPCR validation of transcriptome data

成、促进果实成熟、延缓衰老等过程,且褪黑素与大多数植物激素的变化有关^[28]。外源高浓度的褪黑素可以抑制或延迟种子发芽,表明其在维持种子休眠和防止过早发芽方面发挥作用^[29]。褪黑素可以调控植物信号转导通路中 ABA 和 GA 相关基因的表达,诱导种子萌发并解除休眠^[30]。AP2/ERF 转录因子参与植物生长发育、胁迫响应、防御反应、激素信号转导、代谢物调控等,

还可以反馈调节乙烯、细胞分裂素、赤霉素、脱落酸等植物激素的生物合成^[31]。杏仁 (*Prunus dulcis*) 中的 PdERF24 可能在休眠杏仁对超低温冷冻胁迫的响应中发挥重要作用;在蓝莓 (*Vaccinium* spp.) 花芽休眠解除过程中,多数 VcERF 基因均能表达^[32]。本研究中,在褪黑素处理下,4 个不同生长发育时期的西伯利亚百合小鳞茎的 LoERF-96 基因表达量均高于对照组,且都高于第 1 天的

表3 转录组数据的基因表达量

Tab. 3 Gene expression levels of transcriptome data

基因名称 gene name	基因号 gene ID	FPKM						P值 P-value	基因表达量差异倍数 log ₂ FC
		CK1	CK2	CK3	MT1	MT2	MT3		
<i>LoERF105</i>	TRINITY_DN1258_c0_g1	24.52	44.71	20.79	93.13	77.71	43.91	0.0026	1.4920
<i>CDC5</i>	TRINITY_DN10098_c0_g1	113.32	92.5	110.89	43.36	49.1	40.51	0.0006	-1.0428
<i>MYB36</i>	TRINITY_DN11434_c0_g2	6.45	3.56	5.58	1.69	1.81	1.17	0.0029	-1.4653
<i>WRKY28</i>	TRINITY_DN11579_c0_g1	33.2	8.76	35.61	4.39	10.35	6.76	0.0037	-1.5668
<i>WOX8</i>	TRINITY_DN6545_c0_g1	33.92	16.71	29.25	7.78	6.44	14.02	0.0003	-1.3179
<i>LOB30</i>	TRINITY_DN10132_c0_g1	7.19	5.81	13.36	2.37	3.67	3.67	0.0064	-1.2463

注: FPKM. 每千个碱基的转录每百万映射读取的碎片数, 用于表示基因表达量; FC. 差异倍数; CK1、CK2和CK3为蒸馏水对照组的3个重复, MT1、MT2和MT3为褪黑素处理组的3个重复。

Note: FPKM. fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments, indicating gene expression levels; FC. fold change; CK1, CK2, and CK3 are three repeats of the distilled water control group; MT1, MT2, and MT3 are three repeats of the melatonin treated group.

基因表达量, 说明 *LoERF96* 在褪黑素处理后可以快速响应并表达。该基因的相对表达量总体呈先上升后下降的趋势, 第14天时达到峰值, 且极显著高于对照组; 虽然之后其基因表达量下降, 但仍高于对照组, 这与前人的研究结果^[33]一致。本研究表明: 乙烯响应因子 *LoERF96* 受褪黑素诱导表达, 但该基因在萌发、生长发育等过程中的生物学功能还需进一步研究。

4 结论

本研究对褪黑素处理下的西伯利亚百合小鳞茎进行转录组测序, 通过转录组数据筛选得到780个差异表达基因, 其中, 上调表达基因392个, 下调表达基因388个。这些差异表达基因的KEGG代谢途径主要包括植物激素信号转导、植物MAPK信号途径、苯丙烷生物合成、淀粉和蔗糖代谢、光合作用、碳代谢、内质网中的蛋白质加工等。*LoERF96* 基因是典型的AP2/ERF家族成员, 其编码蛋白为亲水性且无跨膜结构。本研究证明了 *LoERF96* 基因受褪黑素诱导表达, 为探究百合AP2/ERF转录因子在萌发和生长发育过程中的生物学功能提供了理论基础和参考。

[参考文献]

- [1] 赵庆芳, 李巧峡, 丁兰, 等. 西伯利亚百合的组织培养和离体快繁[J]. 甘肃科学学报, 2003, 15(4): 52. DOI: 10.3969/j.issn.1004-0366.2003.04.010.
- [2] 安丽萍, 谢忠奎, 李翊华, 等. 东方百合鳞片生小鳞茎生长过程中的激素变化[J]. 中国沙漠, 2012, 32(3): 705.
- [3] 张计育, 王庆菊, 郭忠仁. 植物AP2/ERF类转录因子研究进展[J]. 遗传, 2012, 34(7): 44. DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00835.
- [4] FENG K, HOU X L, XING G M, et al. Advances in AP2/ERF super-family transcription factors in plant[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2020, 40(6): 750. DOI: 10.1080/07388551.2020.1768509.
- [5] SUN Y F, LIANG B, WANG J, et al. *SlPti4* affects regulation of fruit ripening, seed germination and stress responses by modulating ABA signaling in tomato[J]. Plant and Cell Physiology, 2018, 59(10): 1956. DOI: 10.1093/pcp/pcy111.
- [6] BUSOV V, CARNEROS E, YAKOVLEV I. *EARLY BUD-BREAK1 (EBB1)* defines a conserved mechanism for control of bud-break in woody perennials[J]. Plant Signaling & Behavior, 2016, 11(2): e1073873. DOI: 10.1080/15592324.2015.1073873.
- [7] 杨博, 魏佳, 李坤峰, 等. *PpyERF060-PpyABF3-PpyMADS71*调控乙烯信号通路介导的梨芽休眠进程[J]. 园艺学报, 2022, 49(10): 2249. DOI: 10.16420/j.issn.0513-353x.2022-0585.
- [8] 高玉迪, 李可, 朱友银, 等. 中国樱桃乙烯响应因子 *PpcERF5*基因克隆与功能分析[J]. 植物生理学报, 2021, 57(1): 59. DOI: 10.13592/j.cnki.ppj.2020.0486.
- [9] 庄维兵, 刘天宇, 束小春, 等. 褪黑素在植物生长发育过程中与植物激素的关系[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(31): 12. DOI: 10.13989/j.cnki.0517-6611.2018.31.004.
- [10] DEBNATH B, ISLAM W, LI M, et al. Melatonin mediates enhancement of stress tolerance in plants[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(5): 1040. DOI: 10.3390/ijms20051040.
- [11] MOUSTAFA-FARAG M, ALMONEAFY A, MAHMOUD A, et al. Melatonin and its protective role against biotic stress impacts on plants[J]. Biomolecules, 2020, 10(1): 54. DOI: 10.3390/biom10010054.
- [12] ARNAO M B, HERNÁNDEZ-RUIZ J. Melatonin as a regulatory hub of plant hormone levels and action in stress situations[J]. Plant Biology, 2021, 23(Sup.1): 7. DOI: 10.1111/plb.13202.
- [13] 巩彪, 史庆华. 园艺作物褪黑素的研究进展[J]. 中国农业科学, 2017, 50(12): 2326. DOI: 10.3864/j.issn.0578-1752.2017.12.013.
- [14] ARNAO M B, HERNÁNDEZ-RUIZ J. Melatonin and its

- relationship to plant hormones[J]. *Annals of Botany*, 2018, 121(2): 195. DOI: [10.1093/aob/mcx114](https://doi.org/10.1093/aob/mcx114).
- [15] SHI H T, REITER R J, TAN D X, et al. *INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 17* positively modulates natural leaf senescence through melatonin-mediated pathway in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Pineal Research*, 2014, 58(1): 26. DOI: [10.1111/jpi.12188](https://doi.org/10.1111/jpi.12188).
- [16] 吕馨宁, 王玥, 贾润普, 等. 不同温度下褪黑素处理对‘阳光玫瑰’葡萄采后品质的影响[J]. *中国农业科学*, 2022, 55(7): 1411. DOI: [10.3864/j.issn.0578-1752.2022.07.012](https://doi.org/10.3864/j.issn.0578-1752.2022.07.012).
- [17] WEN D, GONG B, SUN S S, et al. Promoting roles of melatonin in adventitious root development of *Solanum lycopersicum* L. by regulating auxin and nitric oxide signaling[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 718. DOI: [10.3389/fpls.2016.00718](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00718).
- [18] WANG Q N, AN B, WEI Y X, et al. Melatonin regulates root meristem by repressing auxin synthesis and polar auxin transport in *Arabidopsis*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1882. DOI: [10.3389/fpls.2016.01882](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01882).
- [19] ZHANG J, SHI Y, ZHANG X Z, et al. Melatonin suppression of heat-induced leaf senescence involves changes in abscisic acid and cytokinin biosynthesis and signaling pathways in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.)[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2017, 138: 36. DOI: [10.1016/j.envexpbot.2017.02.012](https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.02.012).
- [20] 朱红霞, 李赛楠, 苏文青, 等. 外源褪黑素对胁迫下百日草种子萌发及幼苗生理特性的影响[J]. *山东农业科学*, 2022, 54(9): 64. DOI: [10.14083/j.issn.1001-4942.2022.09.010](https://doi.org/10.14083/j.issn.1001-4942.2022.09.010).
- [21] ZHANG H J, ZHANG N, YANG R C, et al. Melatonin promotes seed germination under high salinity by regulating antioxidant systems, ABA and GA₄ interaction in cucumber (*Cucumis sativus* L.)[J]. *Journal of Pineal Research*, 2014, 57(3): 269. DOI: [10.1111/jpi.12167](https://doi.org/10.1111/jpi.12167).
- [22] ZHANG J, XUE B Y, GAI M Z, et al. Small RNA and transcriptome sequencing reveal a potential miRNA-mediated interaction network that functions during somatic embryogenesis in *Lilium pumilum* DC. Fisch.[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 566. DOI: [10.3389/fpls.2017.00566](https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00566).
- [23] 徐红霞, 李晓颖, 葛航, 等. 基于转录组分析内源激素在调控枇杷花发育进程中的作用[J]. *浙江农业学报*, 2023, 35(7): 1648. DOI: [10.3969/j.issn.1004-1524.20230143](https://doi.org/10.3969/j.issn.1004-1524.20230143).
- [24] 魏玲, 寇明睿, 李雯. 芒果AP2/ERF转录因子*MeERF2*基因的克隆及表达分析[J]. *热带作物学报*, 2024, 45(1): 1. DOI: [10.3969/j.issn.1000-2561.2024.01.001](https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-2561.2024.01.001).
- [25] 张俊, 蔡苏云, 徐子豪, 等. 苦荞*FlERF*基因克隆、生物信息学及其表达分析[J]. *作物杂志*, 2024(2): 23. DOI: [10.16035/j.issn.1001-7283.2024.02.004](https://doi.org/10.16035/j.issn.1001-7283.2024.02.004).
- [26] 吴红漫, 林世扬, 颜彦, 等. 木薯ERF转录因子基因*MeERF5*克隆及表达分析[J]. *南方农业学报*, 2022, 53(9): 2510. DOI: [10.3969/j.issn.2095-1191.2022.09.013](https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-1191.2022.09.013).
- [27] WANG X P, LIU S D, TIAN H N, et al. The small ethylene response factor *ERF96* is involved in the regulation of the abscisic acid response in *Arabidopsis*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 1064. DOI: [10.3389/fpls.2015.01064](https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01064).
- [28] ARNAO M B, HERNÁNDEZ-RUIZ J. Melatonin in flowering, fruit set and fruit ripening[J]. *Plant Reproduction*, 2020, 33(2): 77. DOI: [10.1007/s00497-020-00388-8](https://doi.org/10.1007/s00497-020-00388-8).
- [29] LIU Z, DAI H R, HAO J J, et al. Current research and future directions of melatonin's role in seed germination[J]. *Stress Biology*, 2023, 3(1): 53. DOI: [10.1007/s44154-023-00139-5](https://doi.org/10.1007/s44154-023-00139-5).
- [30] CHEN L, LU B, LIU L T, et al. Melatonin promotes seed germination under salt stress by regulating ABA and GA₃ in cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 162: 506. DOI: [10.1016/j.plaphy.2021.03.029](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.03.029).
- [31] GU C, GUO Z H, HAO P P, et al. Multiple regulatory roles of AP2/ERF transcription factor in angiosperm[J]. *Botanical Studies*, 2017, 58(1): 6. DOI: [10.1186/s40529-016-0159-1](https://doi.org/10.1186/s40529-016-0159-1).
- [32] 马芮, 李瑞雪, 郑煜聆, 等. 蓝莓AP2/ERF基因家族鉴定及其在休眠解除过程中的表达分析研究[J]. *浙江农业科学*, 2022, 63(12): 2854. DOI: [10.16178/j.issn.0528-9017.20220962](https://doi.org/10.16178/j.issn.0528-9017.20220962).
- [33] 王浩, 孙亮, 张济民, 等. 百合AP2/ERF家族转录因子基因*LoERF4*的克隆和生物信息学分析[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2022, 37(6): 1021. DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).202111078](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).202111078).

责任编辑: 何馨成