

基于代谢组学揭示海藻糖促进长春花拮抗低温胁迫机制

高春燕, 常纯皓, 杨楠, 闫雪, 魏鑫, 唐中华*

东北林业大学化学化工与资源利用学院, 黑龙江 哈尔滨
Email: 1269679217@qq.com, *tangzh@nefu.edu.cn

收稿日期: 2021年5月28日; 录用日期: 2021年7月2日; 发布日期: 2021年7月9日

摘要

长春碱和长春质碱具有高效抗癌活性, 而长春花是其重要来源植物。随着人们对抗癌药物原材料需求的增加, 长春花(*Catharanthus roseus*)种植范围逐渐由南向北延伸。随着纬度增加, 气温的降低成为长春花种植、繁育过程中重要的胁迫条件。海藻糖作为一种信号分子能有效地调节植物应对低温胁迫, 而海藻糖促进长春花拮抗低温胁迫的代谢机制仍亟待研究与解决。本实验研究发现: 低温胁迫后外源施加海藻糖, 叶绿素含量与抗氧化酶活性呈现先升高后降低趋势; MDA含量显著降低, 初步验证海藻糖可以提高长春花对低温的耐受性。GC-MS及PLS-DA分析从59种初生代谢产物中发现23种化合物具有显著差异。糖类化合物(如甘露糖)以及一些抗逆物质(如尸胺、硅烷)低温处理后明显积累, 而外源添加海藻糖后其含量显著下降。有机酸类化合物像丙酸、苹果酸、没食子酸等却表现出相反的趋势。说明海藻糖通过调控一些糖类、有机酸和抗逆性等初生代谢物来减少低温带来的伤害。通过real-time PCR对长春花酚类和生物碱代谢途径关键酶基因的表达量以及UPLC-MS测定长春花6种生物碱的变化情况皆可证明长春花次生代谢产物在植物响应低温胁迫过程中也参与其中。

关键词

代谢组学, GC-MS, 生物碱, 低温胁迫, 长春花

Based on Metabonomics Reveals the Mechanism of Trehalose Promoting *Catharanthus roseus* against Low Temperature Stress

Chunyan Gao, Chunhao Chang, Nan Yang, Xue Yan, Xin Wei, Zhonghua Tang*

*通讯作者。

文章引用: 高春燕, 常纯皓, 杨楠, 闫雪, 魏鑫, 唐中华. 基于代谢组学揭示海藻糖促进长春花拮抗低温胁迫机制[J]. 植物学研究, 2021, 10(4): 468-484. DOI: 10.12677/br.2021.104061

School of Chemistry, Chemical Engineering and Resource Utilization, Northeast Forestry University, Harbin Heilongjiang
Email: 1269679217@qq.com, *tangzh@nefu.edu.cn

Received: May 28th, 2021; accepted: Jul. 2nd, 2021; published: Jul. 9th, 2021

Abstract

Vinblastine and vinblastine have highly effective anti-cancer activity, and *Catharanthus roseus* is an important source of plants. With the increasing demand for raw materials for anti-cancer drugs, the cultivation range of *Catharanthus roseus* gradually extends from south to north. As the latitude increases, the decrease of temperature becomes an important stress condition in the process of periwinkle planting and breeding. As a signal molecule, trehalose can effectively regulate plants to respond to low temperature stress, and the metabolic mechanism of trehalose in promoting *Catharanthus roseus* to antagonize low temperature stress still needs to be studied and resolved urgently. This experimental study found that the chlorophyll content and antioxidant enzyme activity showed a trend of first increasing and then decreasing after the exogenous application of trehalose after low temperature stress; the MDA content was significantly reduced, which preliminarily verified that trehalose can improve the tolerance of *Catharanthus roseus* to low temperature. GC-MS and PLA-SD analysis revealed significant differences in 23 compounds from 59 primary metabolites. Carbohydrate compounds (such as mannose) and some anti-stress substances (such as cadaverine, silane) accumulate significantly after low temperature treatment, while the content of trehalose decreases significantly after exogenous addition of trehalose. Organic acid compounds like propionic acid, malic acid, gallic acid, etc. show the opposite trend. It shows that trehalose reduces the damage caused by low temperature by regulating some primary metabolites such as sugars, organic acids and stress resistance. The expression of key enzyme genes in the phenol and alkaloid metabolism pathways of *Catharanthus roseus* by real-time PCR and the changes of the six alkaloids of *Catharanthus roseus* by UPLC-MS can prove that the secondary metabolites of *Catharanthus roseus* respond to low temperature stress in plants.

Keywords

Metabolomics, GC-MS, Alkaloids, Low Temperature Stress, *Catharanthus Roseus*

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

长春花(*Catharanthus roseus*)是夹竹桃科(*Apocynaceae*)长春花属(*Catharanthus*)的一种植物[1], 因其具有 150 多种萜类吲哚类生物碱(terpenoid indole alkaloids, TIAs) [2]而被广泛关注。TIAs 是含有芳香杂环且由异戊二烯组成的一类生物碱, 近年来发现 TIAs 对治疗癌症等具有非常重要的药用价值[3]。因此, 长春花也成为目前应用最为广泛的药源抗癌植物之一。长春花原产于非洲东部, 现广泛栽培于热带和亚热带地区及我国华南、华东以及西南等地, 长春花性喜高温、高湿、喜光, 在温暖和阳光充足环境生长较好。但长春花栽培到北方地区, 因气温寒冷造成长春花不易成活且生长发育缓慢[4]。因此, 为推广长春

花在中国华北以及北方地区种植和繁育，对其低温胁迫机制的研究便显得十分重要。

海藻糖(trehalose)是一种非还原性双糖，在许多生物体中用作碳水化合物的储备物质和应激保护剂。它能帮助植物应对高温、高盐渍、干旱、严寒等极端环境，调节植物的气孔导度和水利用率，并作为信号分子调节植物的生长、发育和代谢[5]。近年来，在烟草(*Nicotiana tabacum*)、水稻(*Oryza sativa*)、番茄(*Lycopersicon esculentum*)等高等植物中也发现海藻糖，但含量甚少。黄瓜(*Cucumis sativus*)是重要的作物之一，有研究结果表明了一定浓度的海藻糖溶液预处理黄瓜幼苗可提高其在低温、高盐和干旱胁迫下的抗逆性[6]。与此同时，海藻糖在缓解长春花低温胁迫的研究还鲜有报道，结合海藻糖原料价格低廉，应用前景广泛等特点，探索海藻糖促进长春花对低温耐受性的研究更具有科研价值与市场价格[7]。

随着实验技术的不断发展，组学在科研中被广泛使用。较之于基因组学和蛋白质组学，代谢组学从最直观地能反映生命活动的代谢物层面进行研究，代谢物能更多地反映细胞或个体所处环境[8]。为了能检测到植物代谢物的变化情况，植物代谢组学应运而生。目前，植物逆境防御过程中，主要是涉及一些模式植物和作物品种。气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)联用技术，是目前代谢组学研究中广泛运用的分析技术并且具有很长的研究历史[9]。目前已发现上调糖类化合物、有机酸类化合物、胺类物质合成是目前植物应对寒冷的生活史策略之一。因此，我们采用 GC-MS 分析技术结合偏最小二乘法分析(Partial least squares Discriminant Analysis, PLS-DA) [10]筛选出低温胁迫后长春花叶片中显著变化的化合物，以及低温胁迫后外加海藻糖这些化合物的变化情况，旨在通过化合物的变化解析海藻糖拮抗低温的作用机制。

鉴于外源海藻糖在植物抗逆中的作用，本试验以长春花幼苗为实验材料，以外源海藻糖为调控手段，初步探讨海藻糖对低温胁迫下长春花幼苗生长、保护酶活性、渗透调节物质、初生代谢以及次生代谢途径关键酶基因表达的影响，揭示海藻糖提高长春花幼苗耐低温的作用机制，为海藻糖在长春花适应低温或冷害应用中提供技术支持及理论依据。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

长春花(*Catharanthus roseus*)种子购于 Syngenta；海藻糖购于北京金泰宏达生物科技有限公司。

2.2. 实验方法

2.2.1. 长春花幼苗培养及处理

长春花种子用体积分数为 10%的次氯酸钠溶液浸泡 10 分钟并在自来水下冲洗 30 分钟，在蒸馏水中吸胀 12 小时后播种于湿润的蛭石中。选择长势一致的幼苗移栽至盛有 Hoagland 营养液(pH5.5)中进行培养。所有培养实验均在植物培养室中进行。培养条件是温度为 25℃/16℃ (白天/黑夜)，白天时间为 14 h，光照强度为 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，相对湿度保持在 70%左右。水培 4 周后对长春花幼苗进行 4℃低温(LT)与海藻糖(T)处理，处理时培养液中加入海藻糖溶液并使其终浓度达到 0、5、10、20 mmol/L，分别标记为 CK、LT、LT + T1、LT + T2 和 LT + T3。每个处理组进行 3 个重复实验，每个重复包括 10 株幼苗，处理时间为 48 小时，处理结束后进行取样进行各项指标的测定。

2.2.2. 叶绿素和丙二醛含量的测定

长春花幼苗植株顶端第二叶序的叶片 0.09 g，用 80%丙酮/无水乙醇体积为 2:1 的混合液，提取低温胁迫后的长春花幼苗叶片鲜样的光合色素，避光静置 24 h。使用 UV-2600 紫外可见分光光度计按照张宪

政的方法测定 665、649 和 480 nm 波长下的吸光值, 从而计算叶绿素 *a*、叶绿素 *b* 以及类胡萝卜素的含量。将处理后的长春花叶片鲜样 0.5 g 在 5 mL 5% 三氯乙酸(TCA)溶液中研磨呈匀浆, 在 4℃, 2504 g 离心 10 分钟, 抽取上清液备用, 采用硫代巴比妥酸(TBA)法在 532、450、600 nm 波长下测定其吸光度值计算丙二醛(malondialdehyde, MDA)的含量。

2.2.3. 抗氧化酶的提取和活性测定

酶液的配制: 称取 0.2 g 新鲜长春花植物叶片的样品, 加入 5 mL 50 mmol/L 磷酸缓冲液 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (pH = 7.8, 含 1.0 mmol/L EDTA 和 1% PVP), 置于振荡破碎仪中研磨成匀浆状态后, 离心机 4℃ 12,000 g, 离心 20 分钟, 取上清液。SOD 的活性是通过氯化硝基四氮唑蓝(NBT)光化学测定方法测定的。反应混合物(3 mL)包含 50 mM 磷酸盐缓冲液(pH 7.8), 13 mM 蛋氨酸, 75 μM NBT, 0.1 mM EDTA, 2 μM 核黄素和 0.1 mL 酶提取物)。POD 活性测定, 加入 1 mL 邻二氨基二苯胺、0.5 mL H_2O_2 、1 mL 磷酸盐缓冲液和 2.4 mL 蒸馏水的混合物, 加入 0.2 mL 酶提取物开始反应, 5 min 后加入 1 mL H_2SO_4 停止反应。CAT 活性的测定, CAT 活性在 50 mL 磷酸盐缓冲液(Ph 7.0)和 0.5%PVP-10 中提取 CAT, 并通过在 240 nm 处测定 H_2O_2 的还原来测定其活性; APX 活性的测, APX 活性反应混合物(3 mL)含有 50 mM 磷酸钾缓冲液(pH 7.0)、0.1 mM EDTA、0.5 mM 抗坏血酸、0.1 mM H_2O_2 和 0.1 mL 酶提取物。

2.2.4. 气质样品预处理与 GC-MS 方法

精密称取 90 mg 长春花叶片鲜样, 放入 1.5 mL 的离心管中进行样品预处理。气相色谱质谱联用仪 (Waters, USA)作为本实验的分析仪器。始 GC 温度为 60℃, 随后柱箱温度以 8℃/min 的升至 125℃, 以 4℃/min 升至 210℃, 以 5℃/min 升至 270℃, 以 10℃/min 升至 305℃, 保持 3 分钟。电子轰击(EI)离子源保持在 260℃, 电压: -70 V, 质量范围为 50~600 m/z, 在 MS 设置下数据采集率为 20 光谱/秒。GC-MS 方法参考刘洋等[11]的方法。

2.2.5. 长春花叶片总 RNA 的提取与次生代谢途径关键酶基因的表达

总 RNA 的提取采用 Trizol 法提取取长春花的处理组和对照组叶片各 0.2 g 放入研钵中, 在液氮中迅速研磨成粉末后, 放入 2 mL 离心管中, 加入 1 mL Trizol 混匀, 室温静置 30 分钟。通过氯仿与异丙醇得到质量较好的总 RNA

Real-Time PCR 仪器为 LightCycler® 96, 使用 SYBR GREEN I 为荧光染料, Real-Time PCR 反应体系如表 1 所示。

Table 1. Real time PCR reaction system

表 1. Real-Time PCR 反应体系

Component	Volume (μL)
SYBR GREEN I	10
Primer F	0.2
Primer R	0.2
cDNA	2
ddH ₂ O	7.6
Total	20

采用常用的 3 步法, 程序设定如下:

第 1 步: 95℃预变性 5 分钟。第 2 步: 95℃变性 20 秒; 50℃退火 15 秒; 72℃延伸 15 秒, 40 个循

环。第3步：72℃延伸10分钟。基因的表达量利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算。

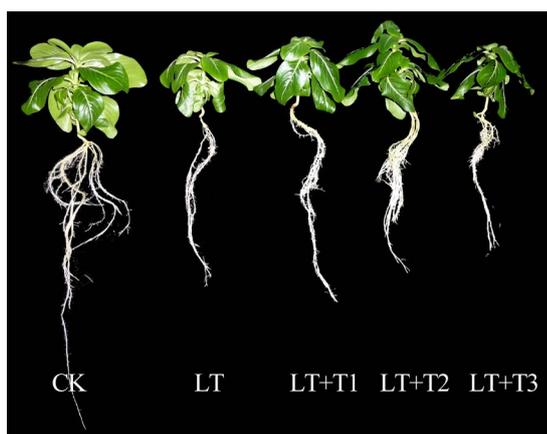
2.3. 数据处理

文中所列数据均为3次重复的平均值，SPSS统计软件(19.0, IBM)对实验数据进行统计分析，并采用GraphPad Prism8软件作图。GC-MS数据采用SIMCA-P 11.0版软件(Umetrics, Umea, 瑞典)获得归一化数据进行多元统计分析。

3. 结果与分析

3.1. 不同浓度海藻糖对低温中长春花表型的影响

在图1中可以看到LT以及LT+T处理后对长春花幼苗形态的影响。与CK相比，在低温胁迫下，长春花幼苗表现出茎与根生长相对较短，叶片更致密，植株矮小、叶片发黄等现象。而低温胁迫后外加海藻糖后根与茎生长与低温处理相比有所增长，但还是低于CK组。



CK: 对照组; LT: 低温处理组; LT + T1: 低温 + 5 mmol/L 海藻糖; LT + T2: 低温 + 10 mmol/L 海藻糖; LT + T3: 低温 + 20 mmol/L 海藻糖

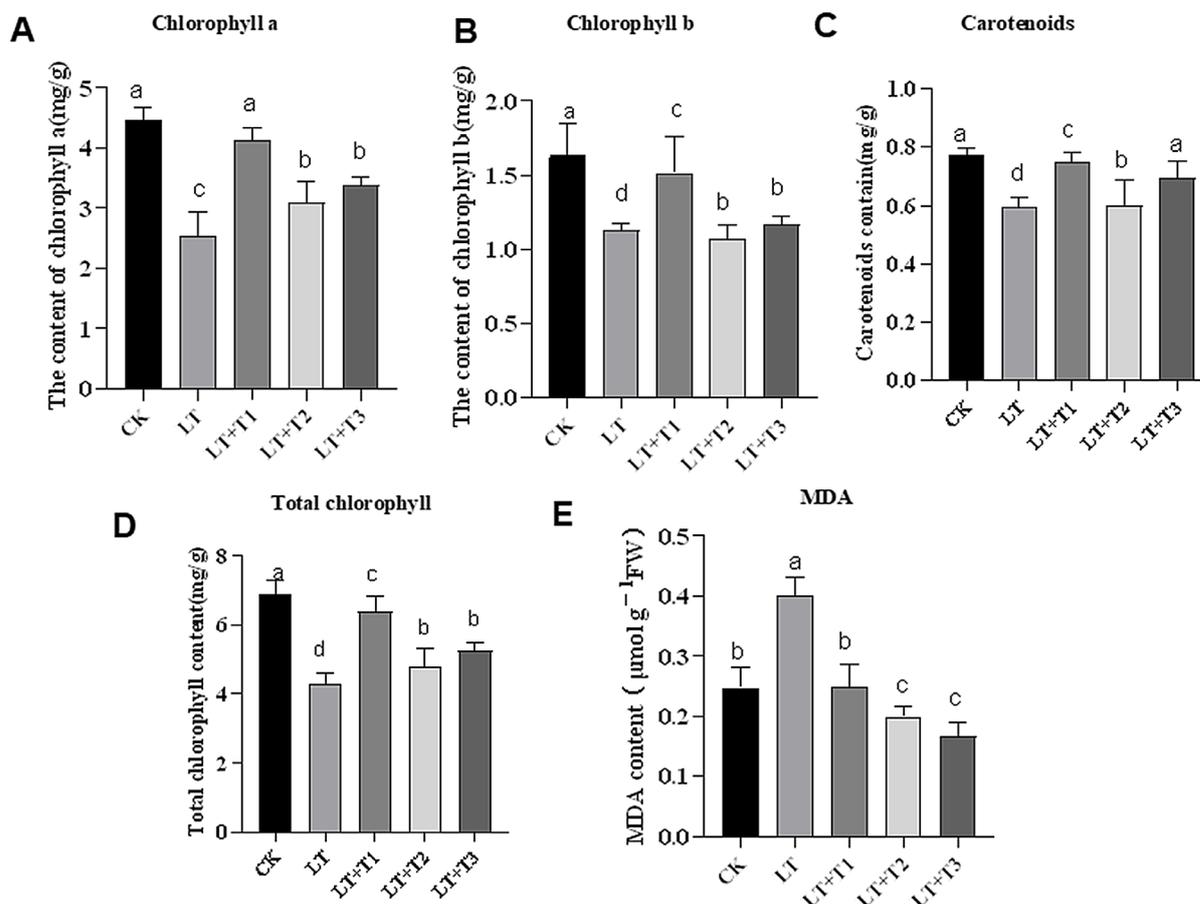
Figure 1. The effect of different concentrations of trehalose on the phenotype of *Catharanthus roseus* at low temperature
图 1. 不同浓度海藻糖对低温中长春花表型的影响

3.2. 不同浓度海藻糖对低温中长春花叶片叶绿素含量的影响

图2(A-D)所示，在低温处理48小时后，随着海藻糖浓度的增加，叶绿素a、叶绿素b、类胡萝卜素以及叶绿素总含量都呈现先升高后降低的趋势并且显著低于CK ($P < 0.05$)。在海藻糖处理浓度为5 mmol/L时，达到最高。叶绿素a、叶绿素b、类胡萝卜素以及叶绿素总含量在施加5 mmol/L海藻糖与LT相比分别增加了61.86%、54.83%、82.84%和61.86%。表明在低温条件下，外源施加一定浓度的海藻糖能够有效促进长春花幼苗叶绿素的合成，且5 mmol/L浓度的海藻糖处理效果最为明显。

3.3. 不同浓度海藻糖对低温中长春花叶片丙二醛含量的影响

图2(E)所示，4℃低温胁迫处理48小时后，与CK相比，MDA的含量显著上升($P < 0.05$)，随着海藻糖浓度的增加，叶片中丙二醛的含量呈现持续降低的趋势，并且明显低于LT ($P < 0.05$)，与LT相比分别降低了37.5%、50%和55.5%，说明在低温处理下，外源施加海藻糖能有效降低叶片中MDA的含量，减少叶片膜脂过氧化程度，缓解低温胁迫带来的伤害。



CK: 对照组; LT: 低温处理组; LT + T1: 低温 + 5 mmol/L 海藻糖; LT + T2: 低温 + 10 mmol/L 海藻糖; LT + T3: 低温 + 20 mmol/L 海藻糖

Figure 2. Changes of chlorophyll content in *Catharanthus roseus* leaves (E). Changes of Malondialdehyde Content in *Catharanthus roseus* leaves. Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$)

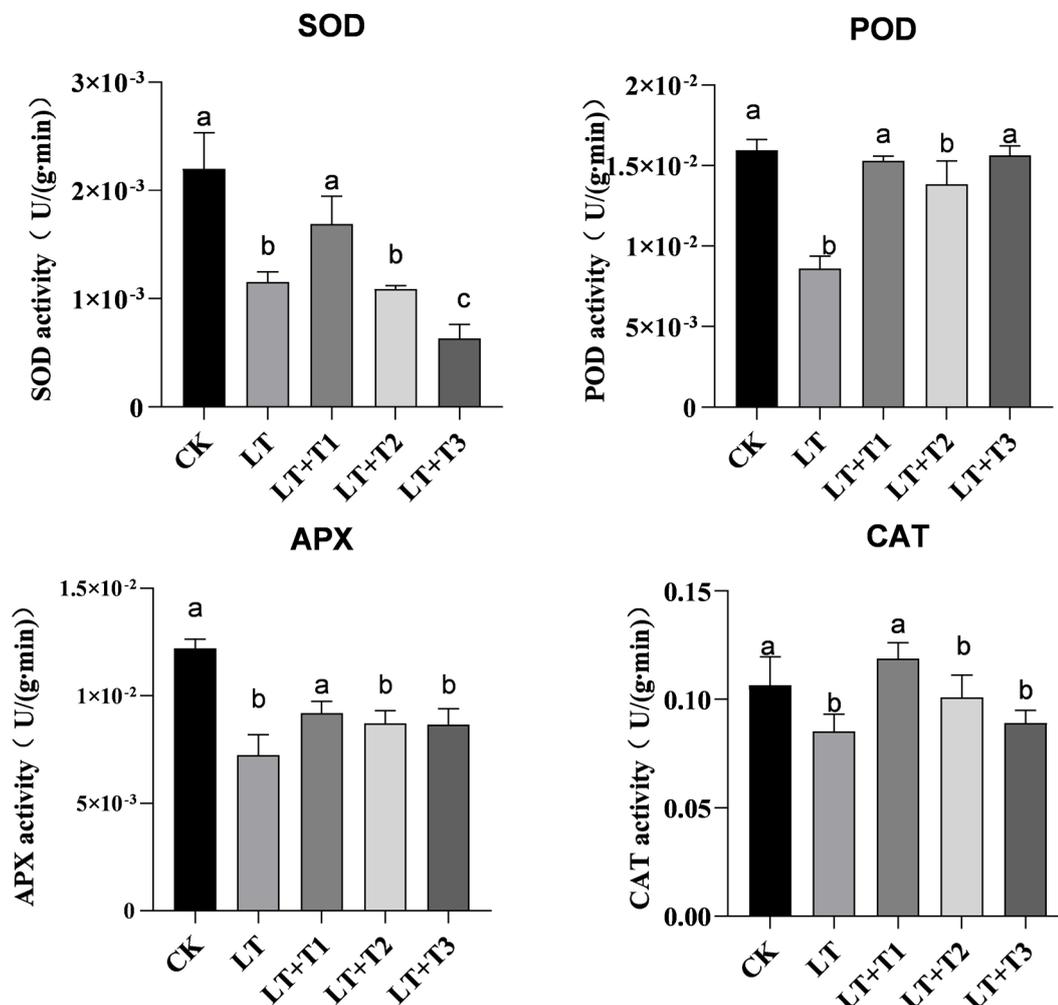
图 2. 长春花叶片叶绿素含量的变化(E)。丙二醛含量的变化。不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)

3.4. 不同浓度海藻糖对低温中长春花叶片保护性酶活性的影响

由图 3 可知, 低温胁迫下长春花幼苗叶片 SOD、POD、CAT 和 APX 活性均低于对照组(CK)的酶活性, LT 中 SOD、POD、APX 和 CAT 与 CK 相比酶活分别降低了 50.9%、46.7%、40%和 25%, 说明低温胁迫后长春花幼苗中抗氧化酶的活性降低。随着外源海藻糖不断增加, 幼苗中酶的活性先升高后降低, 当海藻糖浓度为 5 mmol/L 时, 提升达到最大值; 继续增加海藻糖到 10 mmol/L 后, 幼苗中酶的活性逐渐降低。说明高浓度的海藻糖有抑制抗氧化酶活性的作用。当海藻糖浓度为 5 mmol/L 时, 效果最为显著($P < 0.01$)。说明外源海藻糖可大幅提高低温下抗氧化酶的活性, 且最适宜海藻糖浓度为 5 mmol/L。

3.5. 不同浓度海藻糖对低温中长春花叶片初生代谢物积累的影响

图 4 所示为样品 13 的 GC-MS 原始色谱图。由图可以看出, GC-MS 色谱 S 峰基线较平稳, 且色谱峰被有效的分离, 该方法稳定、可靠, 研究数据可进行后续统计分析和处理。对 GC-MS 原始数据进行预处理后, 根据色谱峰的保留时间等信息在 NIST 数据库和 Wiley Registry 代谢组数据库对检测到的色谱峰定性注释, 共定性出了 59 种代谢产物。



A: 超氧化物歧化酶(SOD) B: 过氧化氢酶(POD) C: 抗坏血酸过氧化物酶(APX) D: CAT 过氧化物酶(CAT)。CK: 对照组; LT: 低温处理组; LT + T1: 低温 + 5 mmol/L 海藻糖; LT + T2: 低温 + 10 mmol/L 海藻糖; LT + T3: 低温 + 20 mmol/L 海藻糖

Figure 3. (A)~(D) Effects of trehalose on protective enzyme activities of *Catharanthus roseus* leaves under low temperature. Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$)

图 3. (A)~(D) 不同浓度海藻糖处理对低温下长春花叶片保护性酶活性的影响。不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)

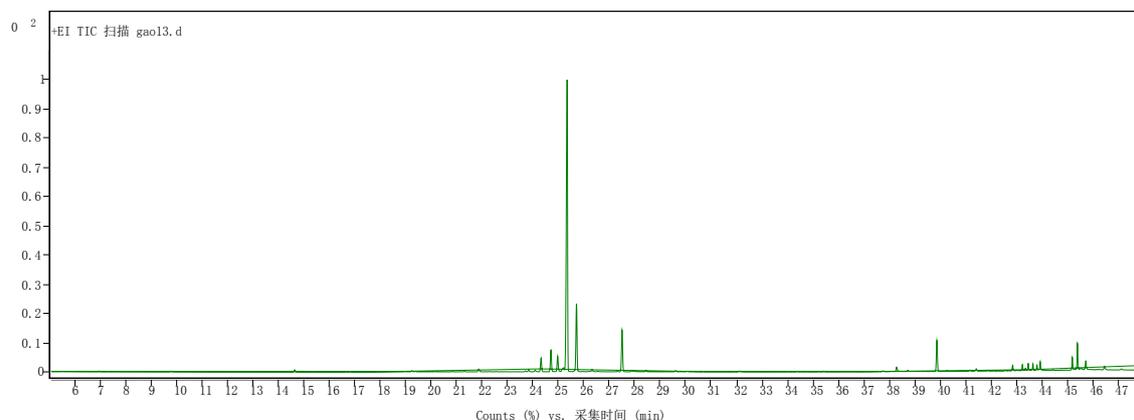
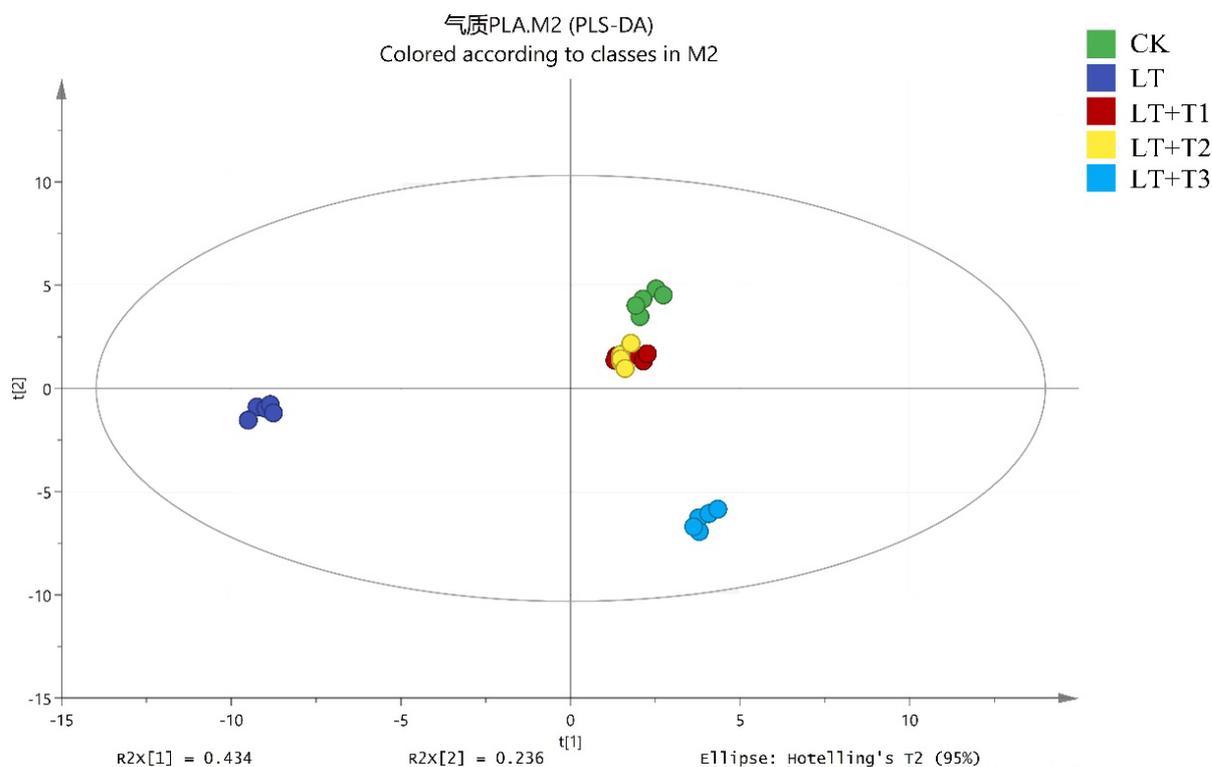


Figure 4. Original chromatogram of GC-MS sample 13

图 4. GC-MS 样品 13 的原始色谱图

研究低温胁迫下不同浓度海藻糖处理下长春花幼苗叶片的初生代谢物的变化差异,对 CK 组和不同实验组进行了偏最小二乘回归分析(PLS-DA 分析)。通过 PLS-DA 方法能较好的将 CK 与处理组区分开($R^2 = 0.0859$, $Q^2 = 0.966$) (图 5), LT 位于置信区间左侧, CK 与低温加海藻糖的组位于置信区间右侧, CK 与 LT + T1、LT + T3 聚在一起区别不大并且 CK 与 LT + T1 几乎完全重叠没有差别。说明 LT + T1 即 5 mmol/L 海藻糖溶液处理效果最佳,其次是 10 mmol/L。低温胁迫外加海藻糖后代代谢物的变化与 CK 相似,证明海藻糖通过影响初生代谢来缓解低温胁迫带来的伤害。



CK: 对照组; LT: 低温处理组; LT + T1: 低温 + 5 mmol/L 海藻糖; LT + T2: 低温 + 10 mmol/L 海藻糖; LT + T3: 低温 + 20 mmol/L 海藻糖

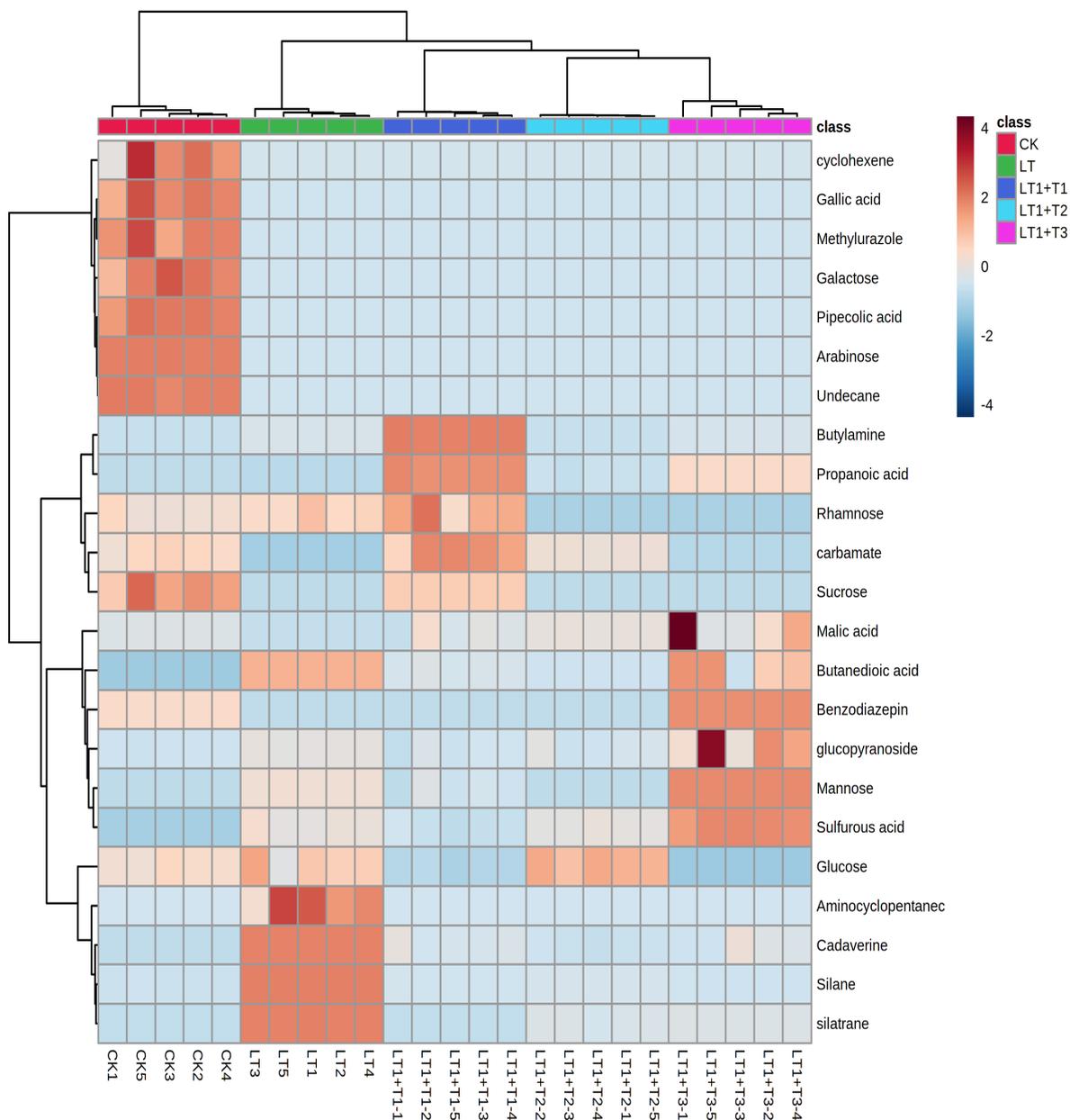
Figure 5. Partial least squares analysis (PLS-DA)

图 5. 偏最小二乘法分析(PLS-DA)

根据模式识别模型的 VIP (variable importance for the projection)值筛选差异代谢物。VIP 值并结合 t 检验,从 59 种初生代谢产物中共鉴定了 23 种具有显著差异的化合物。糖类化合物 7 种、酸类化合物 7 种和其他化合物 9 种。将通过 GC-MS 技术得到的数据归一化处理后,进行聚类分析,得到低温胁迫不同浓度海藻糖处理下长春花叶片差异化合物的热图(图 6)。与 CK 相比,糖类化合物如甘露糖在低温处理后明显积累而低温处理加海藻糖后含量显著降低;有机酸类化合物像丙酸、苹果酸、没食子酸低温处理后含量显著降低低温处理后施加外源添加海藻糖含量显著上升;一些抗逆物质如尸胺、硅烷低温处理后含量显著上升处理后外源添加海藻糖其含量显著下降。

3.6. 差异化合物的代谢途径富集分析

根据 MetaboAnalyst3.0 的通路分析模块,对这些显著变化的代谢物进行代谢途径富集分析。共有 13 条相关代谢途径。路径分析的结果如图 7 所示,最后得出半乳糖代谢、硫代谢、淀粉和蔗糖代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢、柠檬酸循环(TCA 循环)和果糖和甘露糖代谢是 6 种受影响最严重的代谢途径。



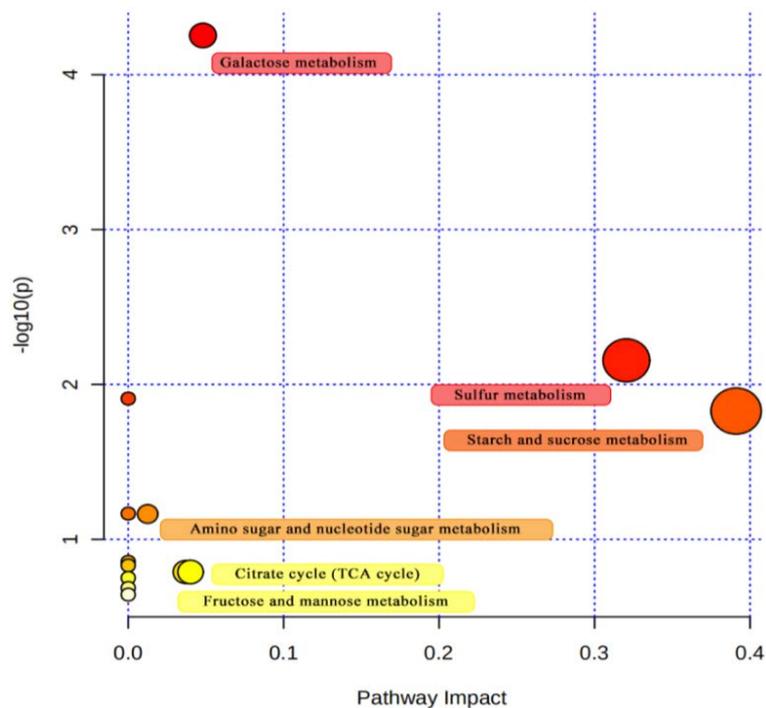
CK: 对照组; LT: 低温处理组; LT + T1: 低温 + 5 mmol/L 海藻糖; LT + T2: 低温 + 10 mmol/L 海藻糖; LT + T3: 低温 + 20 mmol/L 海藻糖

Figure 6. Hierarchical cluster analysis heat map of metabolites with significant difference
图 6. 显著差异代谢物的层次聚类分析热图

3.7. 次生代谢关键酶基因的表达情况

3.7.1. 总 RNA 的提取

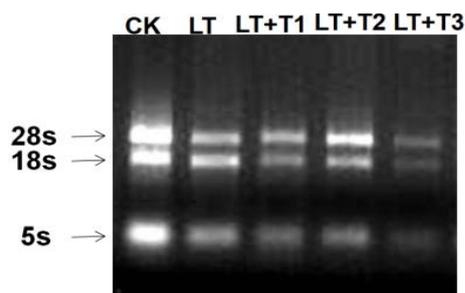
以长春花叶片为材料, 提取总 RNA。用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析总 RNA 质量, 长春花叶片的总 RNA 完整性好, 条带清晰, 共有 3 条条带; 从上到下分别是 28SrRNA、18SrRNA 和 5SrRNA (图 8)。使用 UV-2600 紫外分光光度计检测 RNA 的吸光度(表 2)计算 OD260/280 比值, 均在 1.8~2.0 之间。综上, RNA 的提取质量良好。



CK: 对照组; LT: 低温处理组; LT + T1: 低温 + 5 mmol/L 海藻糖; LT + T2: 低温 + 10 mmol/L 海藻糖; LT + T3: 低温 + 20 mmol/L 海藻糖

Figure 7. Analysis of related metabolic pathways

图 7. 相关代谢途径富集分析



CK: 对照组; LT: 低温处理组; LT + T1: 低温 + 5 mmol/L 海藻糖; LT + T2: 低温 + 10 mmol/L 海藻糖; LT + T3: 低温 + 20 mmol/L 海藻糖

Figure 8. Agarose electrophoresis of total RNA from *Catharanthus roseus* leaves

图 8. 长春花叶片总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

Table 2. OD260/280 ratio

表 2. OD260/280 比值

Sample name	OD260/280
CK	1.94
LT	1.97
LT + T1	1.96
LT + T2	1.88
LT + T3	1.89

CK: Control Check; LT: Low Temperature; LT + T1: Low Temperature + 5 mmol/L Trehalose; LT + T2: Low Temperature + 10 mmol/L Trehalose; LT + T3: Low Temperature + 20 mmol/L Trehalose.

3.7.2. 设计 Real-Time PCR 引物

根据长春花已知酚类代谢途径选取 4 个酶基因(*CrPAL*、*CrC4H*、*CrDXR* 和 *CrOMT*)和生物碱代谢途径选取 4 个关键酶基因(*CrTDC*、*CrSTR*、*CrLAMT* 和 *CrGES*)以及内参基因 *CrActin3*, 利用 Primer Premier 5 设计 Real-Time PCR 的特异性引物, 引物序列如表 3。

Table 3. Primers used in this chapter
表 3. 本章所有的引物

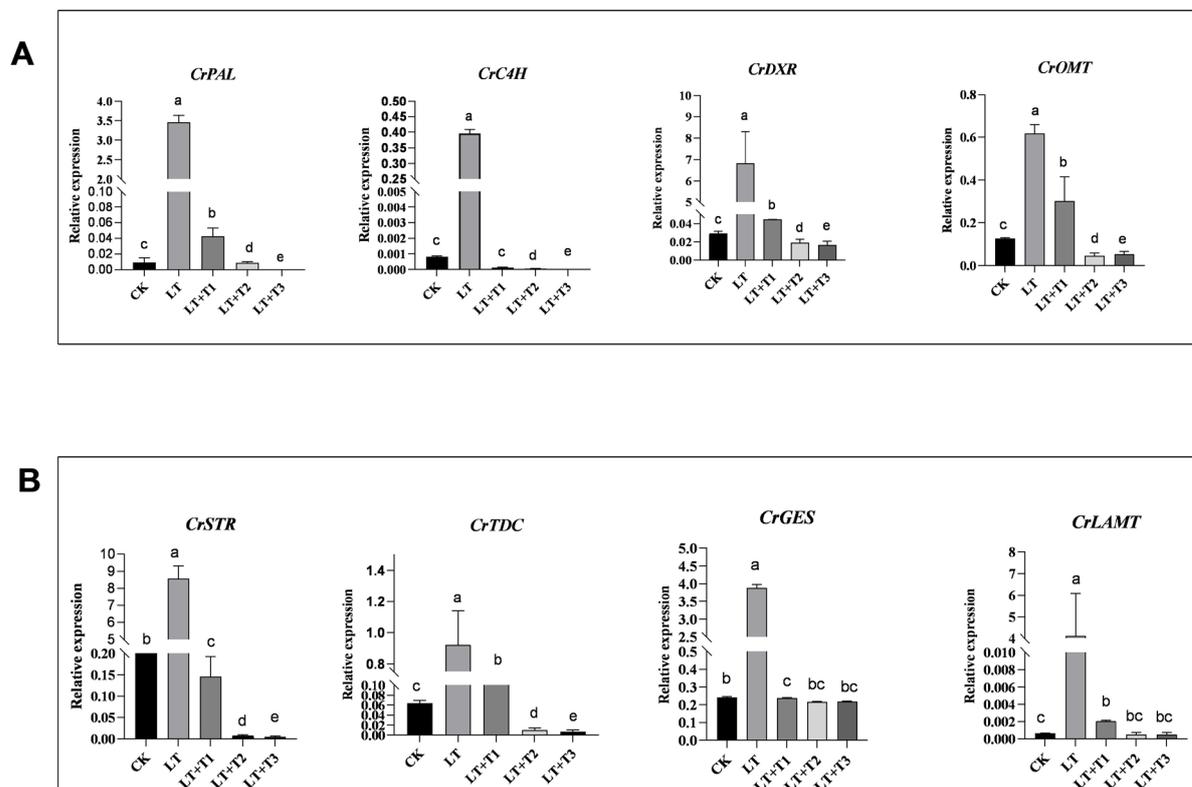
Primer name	Sequence(5'-3')
<i>CrActin3</i> -F	CGGGTCCTCAATTGTCAT
<i>CrActin3</i> -R	AAACTCATCGCCCTCTCAAG
<i>CrPAL</i> -F	TCCCACACACTGCCACACTC
<i>CrPAL</i> -R	CAAGGAGTGATGTTGTGGTT
<i>CrC4H</i> -F	GCTTATTTGCCGCCATCATT
<i>CrC4H</i> -R	TGATTCAAGTCATCCCAAC
<i>CrSTR</i> -F	GGGTTCTACTTCCGTCCA
<i>CrSTR</i> -R	CACAATGGTCTTTTCTCTGG
<i>CrTDC</i> -F	ATCCGATCAAACCCATACCA
<i>CrTDC</i> -R	CGTCATCCTCGACCATTTTT
<i>CrLAMT</i> -F	CACCATGGTTGCCACAATTGATTCC
<i>CrLAMT</i> -R	TTAATTTCCCTTGCGTTTCAAG
<i>CrDXR</i> -F	TCGCTGCAGAACTTAGAGCA
<i>CrDXR</i> -R	GCCAACATCCCAAATGATTC
<i>CrGES</i> -F	CTGATTAAACCCTACCAAAGCT
<i>CrGES</i> -R	AATAATCCCAAAGGCGAAG
<i>CrOMT</i> -F	GTGGATTCTCCATGACTGGAACGA
<i>CrOMT</i> -R	GATTATCACCTTTCACCCTTCGC

3.7.3. 次生代谢关键酶基因的表达情况

CrPAL、*CrC4H*、*CrDXR*、*CrOMT* 是酚类化合物代谢途径关键酶基因(图 9(A))。这些基因在低温处理后均被显著上调。说明低温处理不仅上调生物碱途径也上调酚类代谢途径的上游途径, 而外加海藻糖后均显著下调($P < 0.01$)。苯丙氨酸裂解酶(PAL)是限制长春花中酚类化合物形成的第一个主要酶, *CrPAL* 基因在低温胁迫后显著上调, 与 CK 相比基因表达量增涨了 300 多倍, 说明酚类代谢途径在低温胁迫后显著上调, 酚类化合物的合成是植物应对低温胁迫的一个生活史策略, 通过合成酚类化合物调控自身代谢来实验逆境。外加海藻糖后 *CrPAL* 表达回复到 CK 水平, 说明海藻糖通过调控酚类化合物合成与代谢来缓解低温胁迫的伤害。

CrTDC、*CrLAMT*、*CrSTR* 和 *CrGES* 均是 TIA 生物合成途径中重要的限速酶基因(图 9(B))。低温胁迫后这些关键酶基因的表达均显著上调($P < 0.01$), *CrTDC*、*CrLAMT*、*CrSTR* 和 *CrGES* 与 CK 相比分别上调了 140%、399%、400%和 143%, 表明低温胁迫后会生物碱代谢途径显著上调。而低温胁迫后施加海藻糖, 这些关键酶基因显著下调($P < 0.05$)恢复到 CK 的基因表达, 说明海藻糖通过下调生物碱代谢

来缓解低温胁迫的伤害。



CK: 对照组; LT: 低温处理组; LT + T1: 低温 + 5 mmol/L 海藻糖; LT + T2: 低温 + 10 mmol/L 海藻糖; LT + T3: 低温 + 20 mmol/L 海藻糖

Figure 9. After low temperature stress, trehalose was added to the leaves (A) the expression of key enzyme genes of phenolic pathway (B) the expression of key enzyme genes of alkaloid pathway

图 9. 低温胁迫后外加海藻糖长春花叶片(A)酚类途径关键酶基因表达情况(B)生物碱途径关键酶基因的表达情况

4. 讨论与结论

4.1. 海藻糖对低温胁迫下长春花幼苗生理生化的影响

低温胁迫反应到植物体上有许多可见的变化即植株的表型变化，是环境因素干扰的最直观表现。随着低温胁迫时间的延长，植物叶片有萎蔫、生长迟缓、黄化等直观的现象[12]。在本实验中，长春花幼苗在低温胁迫下，呈现出了叶片萎蔫植株矮小等明显的胁迫症状，外加海藻糖后有一定程度的恢复。说明在表型变化上直观反应了海藻糖可缓解低温胁迫带来的伤害。

植物叶绿体对低温胁迫高度敏感，进而会抑制光合作用及其碳代谢，从超微结构来看这是由于低温损伤细胞器的结构，而且还会改变色素和叶绿体中的代谢物浓度以及气孔调节[13]。越来越多的证据表明，叶绿体可以感知外部刺激并迅速响应外部压力，根据外部胁迫信号并调节与胁迫相关核基因的表达以适应不利的环境条件[14]。低温条件下，光合速率被严重负影响。低温条件下番木瓜(*Carica papaya* L.)叶片中总糖和可溶性蛋白质含量增加，可能是由于低温诱导的渗透胁迫所致[15]。前人研究结果均发现温度降低会导致植物叶片中叶绿素缺失甚至导致植物中叶绿体的结构被破坏，光合能力削弱。本研究中对长春花幼苗的生长表型的观察和光合色素含量测量，发现在低温胁迫下，长春花幼苗长势较差，叶片发黄萎蔫，光合色素含量都降低，严重影响其正常的生长发育，与前人研究结果一致。然而外源施加海藻糖后，长

春花叶片中叶绿素含量显著上升,说明含海藻糖能够有效缓解低温胁迫对长春花幼苗叶绿素与光合作用带来的这种负面影响,促进其生理机能。

丙二醛(MDA)是膜脂过氧化的分解产物,MDA容易与植物体和细胞内的各类蛋白质结合,通过破坏蛋白质的活性,从而破坏膜的结构,因此MDA通常可以作为膜受损程度的指标参数。前人研究发现温度降低与丙二醛含量增高呈现正相关关系。低温(LT)和低辐射(LI)是对植物造成极大危害的常见因素。本研究旨在阐明LT和LI及其恢复对草莓幼苗光合机构、PSII光抑制和活性氧代谢的影响。结果表明,在LI、LT和复合胁迫下,草莓生长缓慢甚至停止,过氧化氢和丙二醛含量增加[16]。另有研究发现低温胁迫损伤了羊草的生长和光合色素,提高了其丙二醛(MDA)、渗透压和酶抗氧化物的积累[17]。在本研究中,低温胁迫对长春花幼苗叶片的MDA含量显著增加,但外源添加不同浓度海藻糖溶液后,MDA含量显著降低,实验结果证明海藻糖能显著降低低温胁迫对细胞膜脂过氧化程度,缓解低温胁迫对长春花幼苗叶片的伤害。

4.2. 海藻糖对低温胁迫下长春花幼苗保护性酶活性的影响

SOD、POD和CAT是一类可以有效清除植物体内活性氧的酶促系统,可反映出植物体内生理代谢状况[18]。在低温胁迫和恢复条件下,研究了施硒对两个草莓品种Akihime和Benihoppe的影响,测定了抗氧化酶活性变化,发现随着低温胁迫时间的延长,超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和过氧化物酶的活性显著降低[19]。对番茄(*Lycopersicon esculentum*)进行低温胁迫处理,发现低温胁迫显著降低叶片中SOD、CAT、POD和APX活性,抑制番茄植株的生长[20]。在对西瓜氧化代谢的影响研究中发现,低温胁迫导致:i)地上部重量降低;ii)H₂O₂的积累;iii)SOD活性降低;iv)与H₂O₂解毒相关的酶活性降低[21]。以玉米杂交种335为材料,发现低温胁迫显著降低了SOD、POD、CAT、GR等抗氧化酶活性,增加GSH、脯氨酸等非酶抗氧化物的含量,诱导一氧化氮(NO)的积累。NO清除c-PTIO和NOS抑制剂L-NAME降低,但NO供体SNP增加CAT和POD酶活性及脯氨酸含量,表明NO介导了EBR诱导的抗氧化能力。说明LT应答基因受NO调控通过调节抗氧化能力和LT反应基因的表达,参与了EBR诱导的玉米胚LT耐受[22]。为了解低温处理(LTC, 12℃处理3d)提高猕猴桃(*Actinidia chinensis*)抗寒性的机制,研究结果发现低温胁迫下丙二醛、超氧自由基和过氧化氢的显著积累和膜透性的增加,超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、抗坏血酸过氧化物酶和过氧化物酶的活性显著降低。处理还保持了较高的内源脱落酸(ABA)、吲哚乙酸(IAA)和玉米素核苷(ZR)水平,较低的赤霉素(GA(3))水平和较高的ABA/GA(3)和ABA/IAA比值[23]。烟草(*Nicotiana tabacum*)和黑麦(*Secale cereale*)在低温下表现出不同的抗氧化防御策略。烟草植株通过提高SOD、APX和CAT的活性,对低温硬化过程中的氧化损伤起到保护作用。由于SOD活性在细胞内的均匀分布,维持了SOD、APX和CAT的组成活性,并且可能由于非酶抗氧化剂的积累,冬黑麦植株能够在硬化过程中产生氧化应激[24]。与前人研究结果一致,在本研究中,LT处理后,抗氧化酶的活性显著降低;外源添加不同浓度的海藻糖后,抗氧化酶的活性显著增强,海藻糖可以提高低温胁迫下长春花幼苗的抗氧化活性,缓解低温处理所带来的抑制作用。

4.3. 海藻糖对低温胁迫下长春花幼苗初生代谢的影响

植物代谢组学的研究包括分析各种具有不同物理性质的化学物质,从离子无机化合物到生物化学衍生的亲水性碳水化合物、有机酸和氨基酸,以及一系列疏水性脂质相关化合物。这种复杂性给当前植物代谢组学研究所采用的分析技术带来了巨大的挑战,需要强有力的分析工具来分离和表征生物样品基质中存在的这种极高的化合物多样性。利用质谱(MS)分析平台来分析胁迫反应的代谢物,使一些植物能够适应不利的环境条件,是当前植物生物技术研究项目中理解和开发耐胁迫植物的基础[25]。植物应对寒

冷的反应是增加糖、有机酸、胺和具有冰点降低、低温保护和抗氧化特性的特殊代谢物的浓度[26]。在对茶树(*Camellia sinensis* L.)的低温胁迫实验中,采用气 GC-MS 和多变量分析方法,发现茶树对不同程度低温胁迫响应有所不同,并能以不同的方式改变自身的代谢途径。这可能有助于从代谢水平上了解茶树抗寒机理,为今后研究冬性茶多酚(DP)和茶多酚(OA)在茶树体内的基因和蛋白表达提供依据[27]。紫罗勒(*Ocimum basilicum*)是罗勒的重要形态变种之一,通过 GC/MS 测定挥发油成分,并用 HPLC 测定三种重要酚酸含量(mg/kg)。在较低温度下芳樟醇含量较高。在两种温度条件下,控制 CO₂ 浓度(400 ppm)苯丙酸总含量最高,并呈规律性下降,迷迭香酸和咖啡酸产量的最高数据是在较低的温度下获得的,而二氧化碳浓度没有规律的趋势[28]。在对矮牵牛(*Petunia hybrida*)低温栽培实验中通过 GC-MS/MS 测定,数据显示了三个连续的低温反应阶段。最初几天的特点是糖的大量积累,特别是在源叶中,同一组织中的基因优先上调,茎尖的几个基因下调,特别是那些参与非生物胁迫反应的基因。中期阶段的特点是碳水化合物水平和基因表达的部分正常化。冷暴露 3 周后,建立了一个新的稳定平衡。茎尖己糖含量降低,茎尖与叶之间的糖含量比值降低,顶端蔗糖/己糖比值升高,与细胞壁转化酶活性和表达降低有关,表明长时间低温诱导源叶糖积累,而减少糖向和的转运降低了茎中蔗糖的利用率[29]。说明糖类化合物代谢在植物应对低温胁迫中起着重要作用。本研究发现糖类化合物半乳糖、葡萄糖、鼠李糖、蔗糖在低温处理后含量显著降低,与前人研究一致有研究采用 GC-MS 分析发现,低温上调了蔗糖代谢、糖酵解、糖异生、发酵和 GABA 分流等一级代谢相关基因,导致蔗糖和苹果酸、柠檬酸、酮戊二酸等有机酸含量下降,己糖和 GABA 积在不同温度条件下(以播种期为基础)生长的花生基因型中分析了各种代谢物[30]。用 GC-MS 对叶片组织进行非靶向代谢组学分析,用 HPLC (多胺)和 UPLC-MS/MS (酚类)另有实验对 pegging 和 pod 灌浆期的代谢产物进行靶向分析。低温胁迫下腐胺的积累量较高[31]。本研究中也证明低温胁迫后腐胺含量显著增高,而低温胁迫外加海藻糖后腐胺含量显著降低,说明海藻糖可能通过调控腐胺代谢来缓解低温胁迫带来的伤害。石莼(*Ulva lactuca*)是一种具有药用和食用潜力的海洋大型藻类,采用 GC-MS 分析了多产链霉菌在温度胁迫下的代谢变化,共鉴定出 67 种化合物。PCA 和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)结果表明,而低温胁迫下有 9 种和 6 种代谢物水平分别显著升高和降低。三羧酸循环和淀粉/蔗糖、酪氨酸和精氨酸/脯氨酸代谢参与低温胁迫反应[32]。与前人研究有相似,亦有不同。本研究通过对差异化合物进行代谢途径富集分析发现半乳糖代谢、硫代谢、淀粉和蔗糖代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢、柠檬酸循环和果糖和甘露糖代谢是 6 条受影响最严重的代谢途径。证明了不同植物在应对低温胁迫时所形成的代谢调控是有差异的,根本原因是基因水平的差异导致物种差异进而导致应对低温胁迫所形成的生活史策略不用,这恰恰也验证了物种间的统一性与差异性。

4.4. 海藻糖对低温胁迫下长春花幼苗关键酶基因表达的影响

酚类化合物由于其氧化还原特性而在植物驱动的抗氧化剂活性中起着重要作用,酚类物质是植物中广泛分布的次生植物代谢物的一大类[33]。低温诱导黄瓜(*Cucumis sativus*)叶片 *CaPAL* 基因的表达和酶活性。AOPP 处理的幼苗 *CaPAL* 活性较低,酚类和黄酮类物质积累较少。低温对黄瓜幼苗造成伤害,AOPP 预处理加重了这种伤害[34]。在对拟南芥冷敏 1-1 (*chs1-1*)的研究中发现 *AtCHS1* 或 *AtCHL1* 的过度表达减轻了低温伤害,促进了植物在中等(24℃)和低温(13℃)温度下的生长,表明这两种蛋白质在生长稳态中都起作用。在红叶芥菜(*Brassica juncea*)的幼苗暴露于低温(8℃) 52 h 胁迫处理中,发现低温胁迫后, *BjPAL* 的表达迅速增加[35]。低温诱导了欧芹(*Petroselinum crispum*)花青素的积累, RNA 凝胶杂交分析表明,二氢黄酮醇 4-还原酶基因(DFR)的表达尤其受低温的影响并且苯丙氨酸解氨酶基因(PAL)和查尔酮合酶基因(CHS)在 12℃和 25℃时均呈协同表达[36],表明酚类化合物的代谢调控受到低温的显著影响, *PcPAL*、*PcCHS* 等酚类化合物合成途径的关键酶基因的表达受到低温的显著调控。另有研究发现短期的低温胁迫

显著影响上调果沙棘(*Hippophae neurocarpa*)试管苗叶片 *HnPAL*、*HnC4H* 和 *Hn4CL* 的活性, 苯丙烷类代谢被激活, 调控黄酮类等次生代谢物质的合成[37]。在非生物胁迫的刺激下, 苯丙氨酸经过一系列酶催化合成花色素苷, 最终通过谷胱甘肽 S-转移酶运输到液泡中, 参与机体防御。Dong 等(2020)通过 15°C/5°C 昼夜低温处理秋海棠(*Begonia grandis*)植株发现低温诱导花色素苷含量显著升高, 并且对响应低温的差异表达基因进行了验证, 结果显示在花色素生物合成途径中关键基因苯丙氨酸解氨酶(*BsPAL*)、查耳酮合酶(*BsCHS*)、黄烷酮 3-羟化酶(*BsF3H*)和花青素合酶基因(*BsANS*)在低温培养条件下显著上调[38]。前人的研究结果说明低温胁迫可显著上调酚类化合物合成途径的关键酶基因的表达, 这与我们的研究结果一致。我们发现低温胁迫下 *CrPAL*、*CrC4H*、*CrICS*、*CrCM*、*CrDXR* 和 *CrOMT* 基因表达均显著上调, 外加海藻糖后这些基因的表达显著下调恢复到 CK 组的表达量。说明海藻糖在基因层面缓解低温对长春花带来的伤害。

长春花中生物碱代谢受到多条代谢途径与多种转录因子的调控。大量研究表明, 在低温胁迫中, CBFs 显著上调可以有效调控表达的功能基因有 COR、DHN (脱水蛋白)、RD (响应脱水)和 LTI (低温诱导)等, 通过调控这些基因的表达可提高植物抵御低温的能力[14]。虽然目前对长春花生物碱途径关键酶基因在低温胁迫下的具体变化研究甚少, 但是先前的研究足以表明生物碱途径受到低温生理因素的影响。本研究通过测定生物碱代谢途径关键酶基因的表达情况发现, 该途径的上游途径在低温胁迫后显著上调, 外加海藻糖后显著下调。与前人研究结果一致, 生物碱与低温胁迫正相关, 低温胁迫会促进生物碱的积累。

低温胁迫显著抑制长春花幼苗的生长发育, 降低了长春花幼苗叶片叶绿素的含量与保护性酶的活性, 提高了 MDA 的含量; 低温胁迫后施加不同浓度的海藻糖, SOD、POD、APX 和 CAT 活性呈现先升高后降低趋势, MDA 含量显著降低; 并且 5 mmol/L 海藻糖浓度效果最佳。GC-MS 及 PLA-SD 分析从 59 种初生代谢产物中发现 23 种化合物具有显著差异。糖类化合物(如甘露糖)以及一些抗逆物质(如尸胺、硅烷)在低温处理后明显积累, 而外源添加海藻糖后其含量显著下降。有机酸类化合物像丙酸、苹果酸、没食子酸等却表现出相反的趋势。说明海藻糖通过调控一些糖类、有机酸和抗逆性等初生代谢物来减少低温带来的伤害。根据长春花已知酚类代谢途径选取 4 个酶基因(*CrPAL*、*CrC4H*、*CrDXR* 和 *CrOMT*)和生物碱代谢途径选取 4 个关键酶基因(*CrTDC*、*CrSTR*、*CrLAMT* 和 *CrGES*)这些关键酶基因在低温胁迫后均显著上调, 外加海藻糖后显著下调。UPLC-MS 测定长春花叶片中 6 种生物碱发现, 文多灵、长春质检、色胺、马钱苷、长春碱和它波宁在低温处理后显著上升, 外加海藻糖后含量均显著下降。说明海藻糖的调控作用也会通过长春花的次生代谢途径缓解低温带来的胁迫。

致 谢

由衷感谢导师唐中华教授在三年研究生学习过程中对我的细心教导以及课题组其他的老师王洪政老师、张衷华老师、郭晓瑞老师以及李德文老师在我生活与实验中的帮助, 感谢刘洋师姐、刘佳师姐、常纯皓师兄、杨楠师姐、闫雪、宋莹等同学以及魏鑫等师弟师妹的帮助。

基金项目

本研究由国家自然科学基金(31400337)资助完成。

参考文献

- [1] 祖元刚, 罗猛, 牟璠松, 等. 长春花生物碱成分及其药理作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(2): 325-329.
- [2] Pan, Q.F., Mustafa, N.R., Tang, K.X., Choi, Y.H. and Verpoorte, R. (2016) Monoterpenoid Indole Alkaloids Biosynthesis and Its Regulation in *Catharanthus roseus* a Literature Review from Genes to Metabolites. *Phytochemistry Re-*

- views, **15**, 221-250. <https://doi.org/10.1007/s11101-015-9406-4>
- [3] Das, A., Sarkar, S., Bhattacharyya, S., *et al.* (2020) Biotechnological Advancements in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **104**, 4811-4835. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10592-1>
- [4] Wang, C., *et al.* (2020) Application of a Trait-Based Species Screening Framework for Vegetation Restoration in a Tropical Coral Island of China. *Functional Ecology*, **34**, 1193-1204. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13553>
- [5] Astrid, W. (2002) The Function of Trehalose Biosynthesis in Plants. *Phytochemistry*, **60**, 437-440. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00137-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00137-1)
- [6] 叶玉秀, 陆大雷, 王飞兵, 等. 干旱胁迫下外源海藻糖对糯玉米幼苗生理特性的影响[J]. 玉米科学, 2020, 139(3): 84-90.
- [7] 聂凌鸿. 海藻糖研究进展[J]. 粮食与油脂, 2002(8): 44-45.
- [8] Yang, N., Zhang, Y., Liu, J., *et al.* (2020) Network during Light-Induced Cotyledons Opening and Greening in *Astragalus membranaceus*. *Journal of Plant Interactions*, **51**, 358-370. <https://doi.org/10.1080/17429145.2020.1831088>
- [9] Tursun, A.O. and Telci, I. (2020) The Effects of Carbon Dioxide and Temperature on Essential Oil Composition of Purple Basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, **23**, 255-265. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2020.1741452>
- [10] 袁园, 唐延林. 偏最小二乘法结合主成分分析对黑茶产地的研究[J]. 大学物理实验, 2020, 33(1): 50-55.
- [11] Lu, X., Chen, Q., Cui, X., *et al.* (2021) Comparative Metabolomics of Two Saline-Alkali Tolerant Plants *Suaeda glauca* and *Puccinellia tenuiflora* Based on GC-MS Platform. *Natural Product Research*, **35**, 499-502. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1633647>
- [12] 成京晋, 李浩, 早浩龙, 等. 植物响应低温胁迫的分子调控机制[J]. 分子植物育种, 2021, 19(9): 3104-3115.
- [13] 程邵丽. 温度对白及光合特性及生理生化指标的影响[D]: [硕士学位论文]. 郑州: 郑州大学, 2019.
- [14] 王芳, 王淇, 赵曦阳. 低温胁迫下植物的表型及生理响应机制研究进展[J]. 分子植物育种, 2019, 17(5): 5144-5153.
- [15] Pradhan, S., Goswami, A.K., Singh, S.K., Prakash, J. and Kumar, A. (2017) Physiological and Biochemical Alterations Due to Low Temperature Stress in Papaya Genotypes. *Indian Journal of Horticulture*, **74**, 491. <https://doi.org/10.5958/0974-0112.2017.00096.2>
- [16] Xu, C., Wang, M.T., Yang, Z.Q. and Zheng, Q.T. (2020) Low Temperature and Low Irradiation Induced Irreversible Damage of Strawberry Seedlings. *Photosynthetica*, **58**, 447-449. <https://doi.org/10.32615/ps.2020.001>
- [17] Anjum, S.A., Ran, W., Niu, J.H., Zohaib, A. and Zong, X.F. (2016) Exogenous Application of ALA Regulates Growth and Physiological Characters of *Leymus chinensis* (Trin.) Tzvel. under Low Temperature Stress. *Journal of Animal and Plant Sciences*, **26**, 1354-1360.
- [18] 陈琪. 镉胁迫对长春花生长代谢的影响及其它元素的调控作用[D]: [硕士学位论文]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2014.
- [19] Huang, C., Qin, N., Sun, L., Yu, M., Hu, W. and Qi, Z. (2018) Selenium Improves Physiological Parameters and Alleviates Oxidative Stress in Strawberry Seedlings under Low-Temperature Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**, 1913. <https://doi.org/10.3390/ijms19071913>
- [20] Latef, A.A.H.A. and He, C.X. (2011) Arbuscular Mycorrhizal Influence on Growth, Photosynthetic Pigments, Osmotic Adjustment and Oxidative Stress in Tomato Plants Subjected to Low Temperature Stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, **33**, 1217-1225. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0650-3>
- [21] Rivero, R.M., Ruiz, J.M., García, P., López-Lefebvre, L. and Romero, L. (2002) Response of Oxidative Metabolism in Watermelon Plants Subjected to Cold Stress. *Functional Plant Biology*, **29**, 643. <https://doi.org/10.1071/PP01013>
- [22] Ma, J.-H., Xing, G.F., Yang, X.H., Wang, Y.G. and Du, H.-L. (2015) Effects of Exogenous EBR and NO Signal on Antioxidant System and Low Response Gene Expression under Cold Stress on Maize Embryo. *The Journal of Applied Ecology*, **26**, 1411-1418.
- [23] Yang, Q., Zhang, Z., Rao, J., *et al.* (2014) Low-Temperature Conditioning Induces Chilling Tolerance in “Hayward” Kiwifruit by Enhancing Antioxidant Enzyme Activity and Regulating Endogenous Hormones Levels. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, **93**, 3691-3699. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6195>
- [24] Popov, V.N. and Naraikina, N.V. (2020) Change of Antioxidant Enzyme Activity during Low-Temperature Hardening of *Nicotiana tabacum* L. and *Secale cereale* L. *Russian Journal of Plant Physiology*, **67**, 898-905. <https://doi.org/10.1134/S1021443720050118>
- [25] Jorge, T.F., Rodrigues, J.A., Caldana, C., *et al.* (2016) Mass Spectrometry-Based Plant Metabolomics: Metabolite Responses to Abiotic Stress. *Mass Spectrometry Reviews*, **35**, 620-649. <https://doi.org/10.1002/mas.21449>

- [26] Schrieber, K., Caceres, Y., Engelmann, A., *et al.* (2020) Elevational Differentiation in Metabolic Cold Stress Responses of an Endemic Mountain Tree. *Environmental and Experimental Botany*, **171**, 221. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103918>
- [27] Shen, J.Z., Wang, Y., Chen, C.S., *et al.* (2015) Metabolite Profiling of Tea (*Camellia sinensis* L.) Leaves in Winter. *Scientia Horticulturae*, **192**, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.05.022>
- [28] Tursun, A.O. and Telci, I. (2020) The Effects of Carbon Dioxide and Temperature on Essential Oil Composition of Purple Basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, **23**, 255-265. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2020.1741452>
- [29] Bauerfeind, M.A., Winkelmann, T., Franken, P. and Druge, U. (2015) Transcriptome, Carbohydrate, and Phytohormone Analysis of *Petunia hybrida* Reveals a Complex Disturbance of Plant Functional Integrity under Mild Chilling Stress. *Frontiers in Plant Science*, **6**, 583-588. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00583>
- [30] Tang, N., Deng, W., Hu, N., Chen, N. and Li, Z.G. (2016) Metabolite and Transcriptomic Analysis Reveals Metabolic and Regulatory Features Associated with Powell Orange Pulp Deterioration during Room Temperature and Cold Storage. *Postharvest Biology and Technology*, **112**, 75-86. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.10.008>
- [31] Raval, S.S., Mahatma, M.K., Chakraborty, K., *et al.* (2018) Metabolomics of Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) Genotypes under Varying Temperature Regimes. *Plant Growth Regulation*, **84**, 493-505. <https://doi.org/10.1007/s10725-017-0356-2>
- [32] He, Y.L., Hu, C.Y., Wang, Y.H., *et al.* (2018) The Metabolic Survival Strategy of Marine Macroalga *Ulva prolifera* under Temperature Stress. *Journal of Applied Phycology*, **30**, 3611-3621. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1493-3>
- [33] Ferreres, F., Pereira, D.M., Valentão, P., *et al.* (2008) New Phenolic Compounds and Antioxidant Potential of *Catharanthus roseus*. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **56**, 9967. <https://doi.org/10.1021/jf8022723>
- [34] Dong, C.J., Liang, L., Ning, C., *et al.* (2015) Roles of Phenylalanine Ammonia-Lyase in Low Temperature Tolerance in Cucumber Seedlings. *Chinese Journal of Applied Ecology*, **26**, 2041-2049.
- [35] 孙梓健, 汤青林, 宋明, 任雪松. 红叶芥低温胁迫下苯丙氨酸解氨酶活性及其基因的克隆表达[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2010, 32(2): 90-94.
- [36] Hasegawa, H., Fukasawa-Akada, T., Okuno, T., *et al.* (2001) Anthocyanin Accumulation and Related Gene Expression in Japanese Parsley (*Oenanthe stolonifera*, DC.) Induced by Low Temperature. *Journal of Plant Physiology*, **158**, 71-78. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00038>
- [37] 宏涛, 陈纹, 李小伟, 苏雪, 孙坤. 低温胁迫下肋果沙棘试管苗黄酮类化合物合成关键酶的活性[J]. 北方园艺, 2015(10): 5-8.
- [38] 谢小东. 烟草 ABC 转运蛋白家族鉴定及次生代谢物质转运的功能研究[D]: [博士学位论文]. 重庆: 重庆大学, 2014.