

张圣美,刘晓慧,尚静,等.高温胁迫对茄子花青素含量及其合成相关酶活性和基因表达的影响[J].上海农业学报,2020,36(6):6-12

高温胁迫对茄子花青素含量及其合成相关酶活性和基因表达的影响

张圣美^{1,2},刘晓慧²,尚静²,张爱冬²,朱宗文²,朱月林^{1*}

(¹南京农业大学园艺学院,南京 210095;²上海市农业科学院设施园艺研究所,上海 201403)

摘要:以紫色茄子(*Solanum melongena* L.)为试验材料,利用人工气候室进行高温处理。以 27 °C 为对照,测定 38 °C 和 45 °C 条件下处理 1 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h、60 h 果皮花青素、类黄酮含量,以及花青素生物合成过程中苯丙氨酸解氨酶(PAL)、查尔酮合成酶(CHS)、查尔酮异构酶(CHI)、二氢黄酮醇还原酶(DFR)、花青素合成酶(ANS)、类黄酮 3-葡萄糖基转移酶(UFGT)的活性,并测定 3 h 和 6 h 时关键酶基因的表达。结果表明:与对照相比,随着时间的延长,高温胁迫诱导花青素和类黄酮浓度显著降低,其中 45 °C 较 38 °C 下降幅度大;PAL 的活性呈现先升高后降低的变化趋势;CHS、CHI、DFR、ANS、UFGT 的活性呈现持续下降的趋势,且高温胁迫下,其活性显著低于对照;处理 3 h 时,*SmPAL*、*Sm4CL* 的表达量随着温度的升高逐渐增加,38 °C 和 45 °C 条件下处理 6 h,其表达量均低于对照。*SmCHI* 的表达量在 38 °C 时显著升高,而在 45 °C 时降低至与对照相当的水平。*SmF3H*、*SmANS*、*SmUFGT* 表达量的变化趋势基本一致,处理时间相同时,温度越高,表达量越低。上述结果表明,高温胁迫降低了茄子果皮花青素合成关键酶的活性及相关基因的表达量,花青素和类黄酮含量降低。

关键词:茄子果皮;高温胁迫;花青素;花青素合成关键酶活性;基因表达

中图分类号:S641.1 文献标志码:A 文章编号:1000-3924(2020)06-006-07

Effects of high temperature stress on anthocyanin concentration, enzyme activities related to its synthesis and gene expression in eggplant

ZHANG Shengmei^{1,2}, LIU Xiaohui², SHANG Jing², ZHANG Aidong², ZHU Zongwen², ZHU Yuejin^{1*}

(¹ College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ² Protected Horticultural Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China)

Abstract: Purple eggplants (*Solanum melongena* L.) as plant materials were treated under 27 °C (CK), 38 °C and 45 °C in phytotron. The concentrations of anthocyanin and flavonoids were measured at 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h and 60 h after treatment. The activities of phenylalanine ammonialyase (PAL), chalcone synthase (CHS), chalcone isomerase (CHI), dihydroflavonol 4-reductase (DFR), anthocyanidin synthase (ANS), flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT) were also determined. The expression levels of genes encoding key enzymes were analyzed at 3 h and 6 h after treatment. The results showed that the concentrations of flavonoids and anthocyanins decreased significantly compared with the control. With the increase of stress time, the activity of PAL increased at first and then decreased; activities of CHS, CHI, DFR, ANS, UFGT showed a continuous descending trend, and their activities were significantly lower than those of the control. The relative expression levels of *SmPAL* and *Sm4CL* were increased gradually with the increase of temperature after 3 h treatment. When the treatment time reached 6 h, the relative expression levels under 38 °C and 45 °C were lower than those of the control. The

收稿日期:2019-10-25

基金项目:上海市农委基础项目[沪农科攻字(2015)第 6-2-3 号];国家重点研发计划(2017YFD0101904);国家大宗蔬菜产业体系(CARS-25)

作者简介:张圣美(1995—),女,在读硕士,从事蔬菜生理与生物技术研究。E-mail:1713904256@qq.com

*通信作者,E-mail:ylzhu@njau.edu.cn

relative expression level of *SmCHI* increased significantly at 38 °C, but decreased at 45 °C to the level of the control. The relative expression levels of *SmF3H*, *SmANS* and *SmUFGT* showed the same trend. The higher the temperature, the lower the expression level. These results indicated that high temperature stress reduced the activities of key enzymes of anthocyanin synthesis and relative expression levels of genes encoding key enzymes for anthocyanin synthesis which resulted in the decrease of the concentrations of flavonoids and anthocyanin in eggplant peel.

Key words: Eggplant peel; High temperature stress; Anthocyanin; Key enzymes in anthocyanin synthesis; Relative expression level

花青素是一种天然的水溶性色素,位于植物细胞的液泡中^[1],是花和果实的着色物质^[2],属于酚类化合物中的类黄酮次级代谢产物^[3]。花青素能通过调节相关酶的活性抑制癌变、预防心脑血管疾病及糖尿病的发生^[4]。除此之外,花青素还可以帮助植物抵抗各种生物和非生物胁迫^[5],研究表明,花青素含量较高的转基因番茄植株耐热性较强^[6]。花青素的合成一般分为三步,首先是苯丙氨酸作为前体物质合成4-香豆酰 CoA,这一阶段的关键酶是苯丙氨酸解氨酶(phenylalanin ammonialyase, PAL)、肉桂酸4-羟化酶(cinnamate 4-hydroxylase, C4H)、4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4-coumarate CoA ligase, 4CL);第二阶段是合成二氢黄酮醇类物质,此阶段是类黄酮物质合成的关键阶段,查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)、查尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)是催化这一步的主要酶类;第三阶段是在二氢黄酮醇4-还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)、花青素合成酶(anthocyanidin synthase, ANS)的催化下形成各种花青素。此时,花青素还处于不稳定的阶段,需要通过类黄酮 3-葡萄糖基转移酶(flavonoid 3-O-glucosyltransferase, 3GT)糖基化反应使花青素形成稳定的结构,进而运输到液泡中贮存起来^[7]。

茄子(*Solanum melongena* L.)属于茄科茄属,直立分枝草本至亚灌木,果皮中含有丰富的抗氧化性较强的花青素,具有很高的食用价值^[8,9]。茄子开花结果期的适宜温度为 25—30 °C^[10-11],超过 35 °C 会对茄子的生长发育产生不利影响^[12],造成其形态结构以及生理状态异常、品质降低、产量减少^[13],同时,高温会通过削弱合成和增加分解的方式使植物中的花青素含量降低^[14]。

目前关于高温胁迫对茄子表皮花青素合成相关酶的影响方面的研究较少,本研究通过研究高温对茄子果皮类黄酮和花青素浓度、花青素生物合成过程主要酶的活性以及相关酶基因的表达量的影响,探究高温胁迫对茄子果皮花青素产生的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试茄子(*Solanum melongena* L.)品种为上海市农业科学院自主选育品种‘特旺达’。

1.2 试验处理

2018年6月25日在上海市农业科学院庄行试验站播种,10月30日选择生长期相近、果实生长量相似的茄子植株18株,将其随机分成3组,每组6株,移入人工气候室内进行27 °C(CK)、38 °C和45 °C处理。各处理的光照时间为12 h光照/12 h黑暗、光照强度为500 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、相对湿度为70%。分别在处理0 h、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h、60 h时削皮取样,取样时尽量少带果肉,测定花青素、类黄酮的浓度,以及PAL、CHS、CHI、DFR、ANS、UFGT的活性。每个处理3次生物学重复。

1.3 测定指标与方法

1.3.1 茄子果皮花青素、类黄酮浓度以及相关酶活性的测定

采用酶联免疫分析(ELISA)试剂盒(江苏酶免实业有限公司),参考吴翠平^[15]的方法,略加改动进行测定。将0.1 g的茄子果皮用液氮研磨后加入0.9 mL的0.05 mol/L、pH 7.8的磷酸缓冲溶液,1 000 g、4 °C离心20 min,取上清液。酶标板上的微孔包被着待测酶的抗体,将样品作为抗原添加到微孔板中并加入样品稀释液和辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP)结合物,37 °C温育,洗涤液洗涤5次。用底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB)显色,温育15 min,加入1 mol/L的硫酸终止反应,450 nm下测定吸光度(OD),绘制标准曲线,计算样品花青素与类黄酮的浓度以及各个酶的活性。

1.3.2 花青素合成相关酶基因的 qRT-PCR

使用 TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit 提取 RNA,1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,使用微量核酸蛋白分析仪进行浓度和纯度的测定。使用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒进行反转录,使用 TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒进行实时荧光定量,以上试剂均购自日本 TAKARA 公司。

根据转录组测序结果^[16]进行待测基因的选择,目标基因特异性引物见表 1,以茄子 *PGK* 为内参基因^[17],由北京擎科生物科技有限公司进行引物合成,使用 Applied Biosystems Quantstudio 5 (ABI, USA) 进行检测,设置 3 次重复,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法^[18]进行结果分析。

表 1 基因的特异性引物序列
Table 1 Gene-specific primer sequences

基因 ID	基因名称	引物序列 5'-3'	
		正向引物	反向引物
Sme2.5_01 945.1_g00 010.1	<i>PGK</i>	TCGCTCTTGGAGAAGGTTGAC	CTTGTGCGCAATCACTACATCAG
Sme2.5_00 209.1_g00 001.1	<i>SmPAL</i>	TTGGGTAATGGATAGTATGTGC	TAAGTTCCTTTTGAAGTGCTCC
Sme2.5_08 703.1_g00 001.1	<i>Sm4CL</i>	CTGTTGTGAGGAATGCGGAGATGAA	TCCTTCTTGTCTATGGTTCTTGTGTG
Sme2.5_01 196.1_g00 007.1	<i>SmCHI</i>	GAAGCACAGGATACACAGAAGAATTAGCA	TCCAGTTCCAAGCAATGACAATGAAGT
Sme2.5_04 260.1_g00 001.1	<i>SmF3H</i>	GCCACACTGATGGTAACTTCTTGACT	TCTCCAGCCATTGTTACTCTGTGAATT
Sme2.5_01 638.1_g00 005.1	<i>SmANS</i>	GAGAAGAAAGAAGAAGGACCTCAAGTACC	CGACGCCAAGTGCTAGTTATGTAATCA
Sm e2.5_00 319.1_g00 012.1	<i>SmUFGT</i>	ACATTGACGAGTGAACAACCTACTGAG	GGTGATTAAGAATCGCTACTTGTGGAG

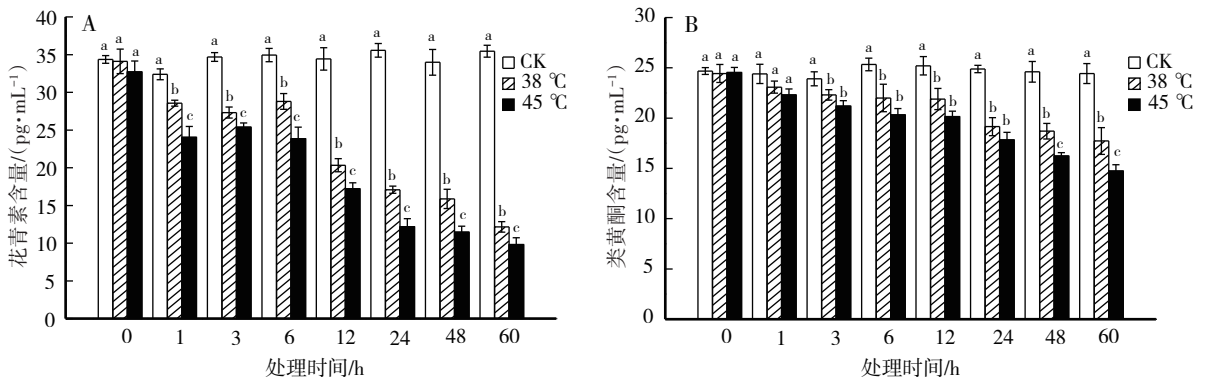
1.4 数据处理

使用 Origin 8.0 软件绘图,SPSS 19.0 统计软件进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 高温胁迫对茄子果皮花青素和类黄酮含量的影响

图 1A 显示,随处理时间的延长,高温胁迫下,花青素的含量呈不断降低趋势,与对照相比差异显著,且 45 °C 处理比 38 °C 处理下降的幅度大。38 °C 和 45 °C 处理 6 h 时,茄子果皮中花青素含量分别比处理 0 h 时低 64.37% 和 69.99%,比 CK 低 65.72% 和 72.32%。



同一处理时间不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。下同

图 1 高温胁迫对茄子果皮花青素和类黄酮含量的影响

Fig. 1 Effect of high temperature stress on the concentration of anthocyanin and flavonoids in eggplant peel

由图 1B 可知,随着时间的延长,38 °C 和 45 °C 处理下类黄酮含量呈现出持续下降的趋势,且与 CK 间差异显著。当胁迫 60 h 时,38 °C 处理类黄酮含量较对照下降了 27.47%,45 °C 较对照下降了 39.71%。当处理 48 h 和 60 h 时,CK、38 °C、45 °C 处理间的类黄酮含量呈显著差异,说明高温胁迫时间的延长会导致类黄酮含量下降。

2.2 高温胁迫对茄子果皮 PAL 活性的影响

由图 2 可知,随着时间的延长,38 °C 条件下,PAL 活性呈先平缓后升高而后再下降的趋势,24 h 时达到最大值,比 CK 高 16.93%。在 45 °C 条件下,PAL 活性呈现出先升高后降低的趋势,处理 12 h 时达到最大值,较 CK 高 20.52%,比 38 °C 条件下高 8.91%。

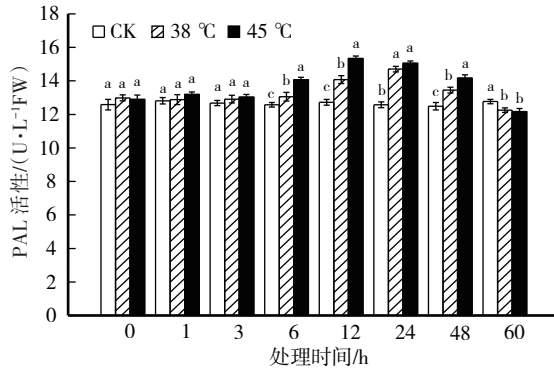


图2 高温胁迫对茄子果皮 PAL 活性的影响

Fig. 2 Effect of high temperature stress on PAL activity in eggplant peel

2.3 高温胁迫对茄子果皮 CHS 和 CHI 活性的影响

由图3A可知,随着时间的延长,38 °C和45 °C高温胁迫下CHS活性呈下降的趋势,在处理60 h时最低,与CK相比分别下降39.34%和51.34%。

查尔酮异构酶(CHI)的活性变化与CHS活性变化相似,38 °C高温胁迫60 h时较对照降低54.96%。45 °C胁迫下,除处理0 h和1 h外,其余的处理时间下茄子果皮中CHI活性均与CK和38 °C时有显著差异(图3B)。

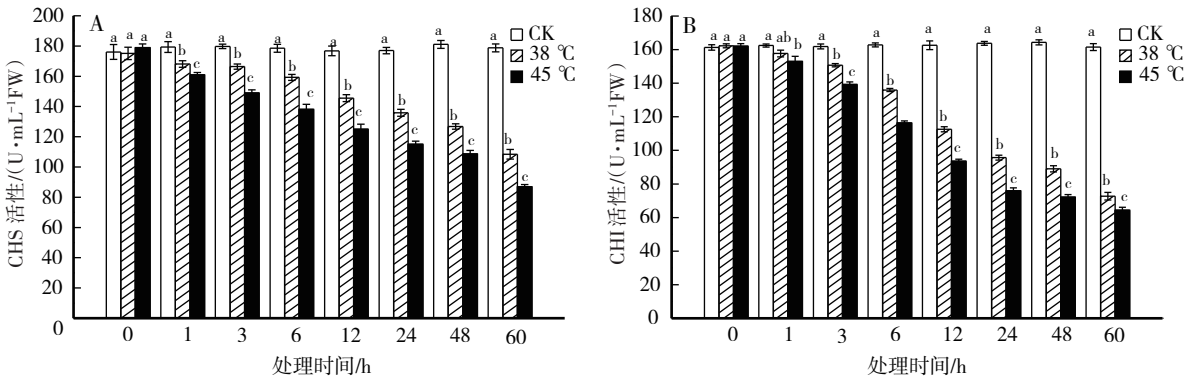


图3 高温胁迫对茄子果皮 CHS 和 CHI 活性的影响

Fig. 3 Effect of high temperature stress on CHS and CHI activity in eggplant peel

2.4 高温胁迫对茄子果皮中 DFR、ANS、UFGT 酶活性的影响

如图4A所示,随时间延长,在38 °C高温下,二氢黄酮醇还原酶(DFR)活性呈明显下降趋势,处理48 h和60 h时分别较对照下降36.61%和47.24%。45 °C条件下,茄子果皮DFR活性与CK和38 °C时相比显著降低,随着高温处理时间的延长,DFR活性也在不断的降低,60 h时达到最低值,比对照低73.24%。

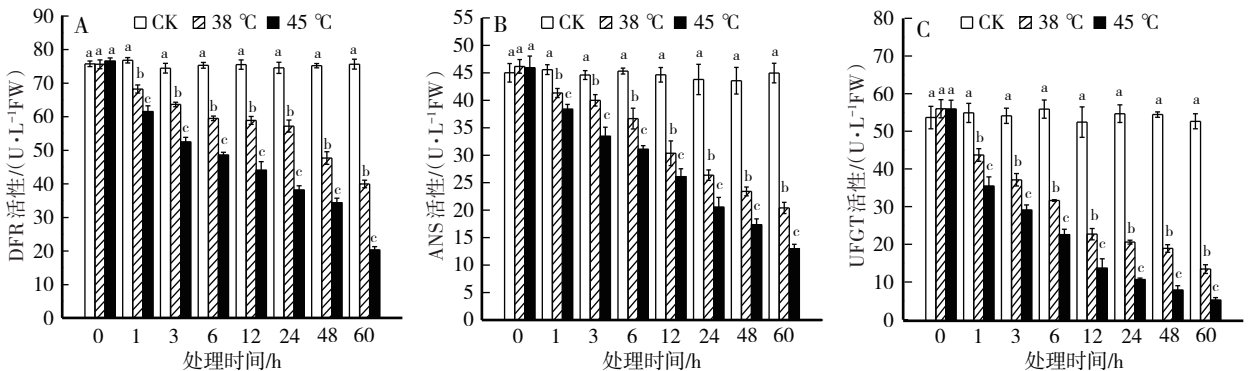


图4 高温胁迫对茄子果皮 DFR、ANS 和 UFGT 活性的影响

Fig. 4 Effect of high temperature stress on DFR, ANS and UFGT activity in eggplant peel

图4B显示,随时间延长,高温处理后的花青素合成酶(ANS)活性呈下降趋势,45 °C比38 °C条件下下降的多。除0 h外,其余处理间差异显著。在处理60 h时,38 °C时较CK减少了54.61%,较处理0 h减

少了 55.80%;45 °C 处理与 CK 相比减少了 71.15%,与 0 h 相比减少了 71.74%。

由图 4C 可知,随着时间的延长,高温胁迫下 UFGT 活性呈现出明显下降趋势,其中 45 °C 较 38 °C 条件下下降的多,且差异显著,处理 60 h 时,38 °C 条件下较处理 0 h 下降了 76.04%,较 CK 下降了 74.51%;45 °C 条件下,比未处理时下降了 90.79%,比 CK 下降了 90.22%。

2.5 高温胁迫对茄子果皮中花青素合成相关酶基因相对表达量的影响

由图 5 可知,处理 3 h 时,*SmPAL* 基因的表达量随着温度的升高逐渐升高;处理 6 h 时,38 °C 和 45 °C 下 *SmPAL* 基因的表达量均小于对照,且 38 °C 时表达量更低。在处理 3 h 时,38 °C 条件下 *Sm4CL* 基因的表达量较对照高,45 °C 条件下与对照相比显著上升;处理 6 h 时,38 °C 与 45 °C 时该基因的表达量均较对照显著下降。*SmCHI* 基因的表达量在处理 3 h 和 6 h 时显示出相同的规律,在 38 °C 时显著升高,而在温度达到 45 °C 时其表达量降低到与对照相当的水平。相同处理时间下,温度越高,*SmF3H*、*SmANS*、*SmUFGT* 基因的表达量越低。

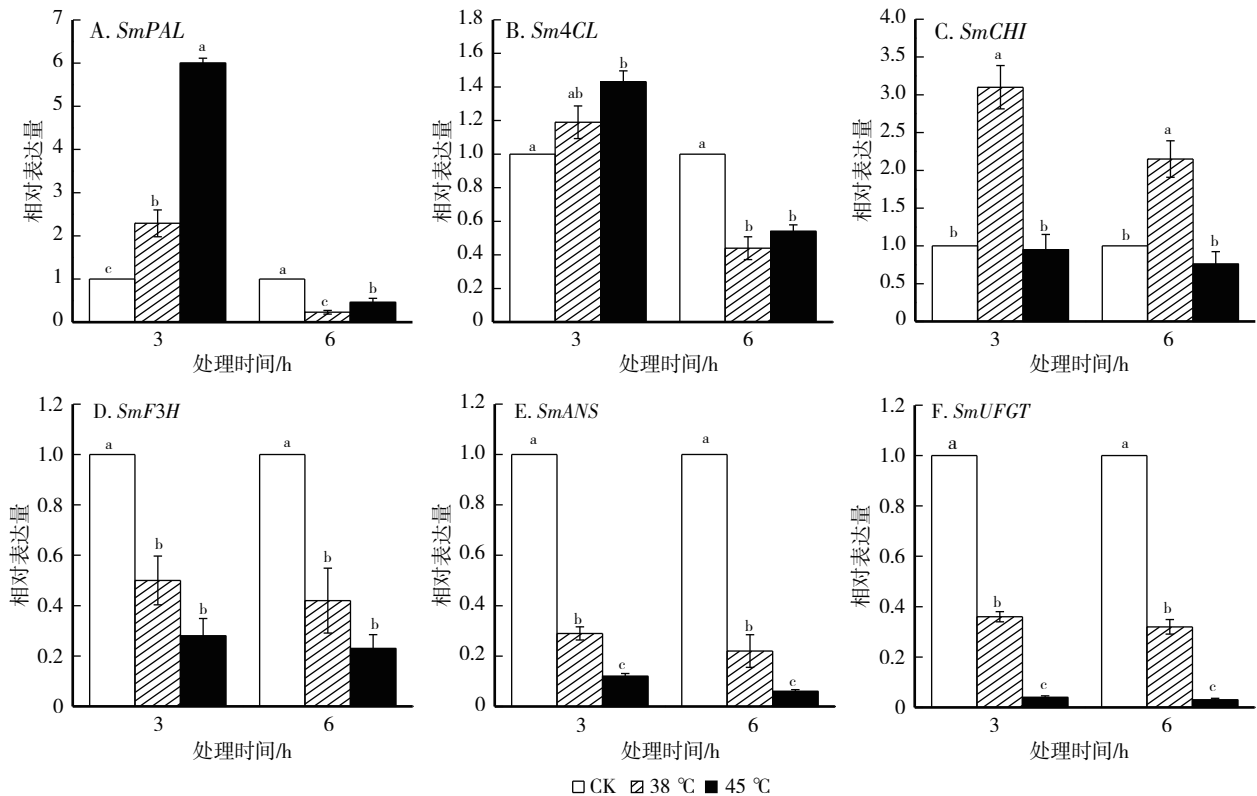


图 5 高温胁迫对茄子果皮花青素合成关键酶基因表达量的影响

Fig. 5 Effects of high temperature stress on the relative expression levels of genes encoding key enzymes for anthocyanin synthesis in eggplant peel

3 结论与讨论

牡丹妮等^[19]研究表明,低温会诱导花青素合成过程中结构基因的表达,从而使花青素的含量上升。而在高温环境时,花青素的合成会受到抑制,罗兰^[20]研究发现,花青素在细胞质中是不稳定的,会与糖苷键结合形成花青苷运送到液泡中贮存,而高温会使呼吸速率加快,当植物体的碳水化合物储备不足时,花青苷的糖苷键会发生水解以补充植物体所需能量,进而抑制花青素的合成;YAMANE 等^[21]发现,高温会抑制花青素合成的相关酶的活性,使花青素的合成减少,降解增多,从而使其含量显著降低。本研究结果表明,随着高温胁迫时间的延长,花青素的含量不断下降,且与 CK 之间存在显著差异,其中 45 °C 比 38 °C 条件下下降多,表明较高的胁迫温度与较长的胁迫时间,会加剧茄子果皮花青素含量的减少。

类黄酮是一类植物次生代谢物质,花青素属于类黄酮物质中的一种,一些关键酶的活性以及基因的表达量会直接影响到黄酮类化合物的合成和积累。研究表明,适度低温会促进黄酮类化合物的累积^[22],而高温会导致黄酮的含量减少^[23],与本研究结果一致。

苯丙氨酸解氨酶(PAL)是苯丙烷代谢途径的重要调控位点,是合成花青素的限速酶,常作为衡量植物抗逆性强弱的指标^[24]。吴雪霞等^[25]研究表明,在高温胁迫下,PAL的活性呈现出先上升后下降的趋势。Pan等^[26]研究表明,为减少热胁迫对植物造成的伤害,PAL的活性会增加,进而使游离态SA增加。陈雷等^[27]研究表明,在植物受到温度胁迫时,其PAL活性会显著上升,随着胁迫时间的延长,其活性逐渐下降。本试验中,在38℃及45℃高温胁迫下,随着时间的延长,PAL的活性呈先上升后下降的趋势,这与前人的研究结果一致,推测PAL作用于花青素生物合成比较上游的位置,类黄酮的生物合成还存在其他分支路径,PAL活性与花青素的含量之间不存在显著的相关性。

在花青素生物合成途径第二阶段中,CHS和CHI具有非常关键的作用,CHS催化形成的查尔酮为类黄酮代谢提供碳架结构,研究表明,CHS基因过表达的拟南芥植株叶片会形成更多的花青素^[28]。CHI可以将黄色查尔酮从容易离子化的双环状态转化为具有生物学活性的无色三环结构——黄酮^[29]。刘金花^[30]发现,在黄芩种子萌发和生长过程中,CHS活性会随着温度的升高不断下降,且在30℃左右时下降最多。本试验结果表明,高温会抑制查尔酮合成酶(CHS)和查尔酮异构酶(CHI)活性,并且随着胁迫时间的延长,其活性会呈不断下降的趋势。

花青素生物合成的第三阶段涉及到三个比较关键的酶,DFR可以催化二氢黄酮醇形成各种无色的花青素,ANS将无色的花青素加氧转变为有色花青素,然后由UFGT催化形成花青素苷^[31]。研究发现,紫心甘薯DFR活性与花青素的合成密切相关,当DFR活性较高时,花青素的含量也较高,反之,当DFR的活性下降时,花青素的含量也会降低,其作为关键酶参与到了甘薯花色苷的代谢活动中^[32]。吴雪霞等^[25]研究表明,高温会降低DFR、ANS、UFGT活性。李小兰等^[33]发现温度是调控ANS表达的重要环境因子之一,推测在高温下合成的花青素较低温少。李智^[34]研究证实高温使ANS基因的表达受到抑制,从而使花青素的合成量减少,Huh等^[35]研究表明ANS的表达水平受高温的影响比较大。随着夜间温度的升高,与花青素合成相关基因的表达以及UFGT的活性会受到抑制^[36]。本研究表明,在高温胁迫下,DFR、ANS和UFGT活性均随着胁迫温度的升高和胁迫时间的延长不断降低。

温度是对花青素合成相关基因表达量产生影响的一个重要的因素^[37],高温会使关键酶基因的表达受到抑制^[38],Liu等^[14]报道花青素的生物合成过程中相关的结构基因可以分为早期基因和晚期基因,CHS、CHI、F3H属于早期基因,而DFR、ANS、UFGT属于晚期基因,早期基因的表达与花青素的含量之间没有显著的相关性,而晚期基因是合成特定类黄酮所必需的,其基因的表达水平与花青素的含量呈正相关。本研究表明,SmPAL和SmCHI基因的表达量与花青素的含量变化不一致,而SmACL、SmANS、SmUFGT则同花青素的含量变化趋势一致。这可能是由于早期基因不仅要参与花青素的合成,同时也参与其他分支阶段,如木质素的合成所导致的。

综上,高温降低花青素合成途径中关键酶的活性以及一些关键酶基因的表达量,进而使得花青素与类黄酮的含量降低。

参 考 文 献

- [1] SMERIGLIO A, BARRECA D, BELLOCCO E, et al. Chemistry, pharmacology and health benefits of anthocyanins[J]. *Phytotherapy Research*, 2016, 30: 1265-1286.
- [2] SHI Q Q, ZHOU L, LI K. Transcriptional regulation involved in anthocyanin biosynthesis in plants[J]. *Forest Research*, 2015, 28(4): 570-576.
- [3] 甘蓓, 杨红玉. 拟南芥中类黄酮代谢途径及其调控[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(13): 5290-5292, 5304.
- [4] ROZANSKA D, REGULAKA-ILOW B. The significance of anthocyanins in the prevention and treatment of type 2 diabetes[J]. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 2018, 27(1): 135-142.
- [5] AHMED N U, PARK J I, JUNG H J, et al. Characterization of dihydroflavonol 4-reductase (DFR) genes and their association with cold and freezing stress in *Brassica rapa*[J]. *Gene*, 2014, 550(1): 46-55.
- [6] MENG X, WANG J R, WANG G D, et al. An R2R3-MYB gene, *LeAN2*, positively regulated the thermo-tolerance in transgenic tomato[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2015, 175: 1-8.
- [7] 吴雪霞, 张爱冬, 朱宗文, 等. 植物花青素生物合成代谢途径及调控因子研究[J]. *上海农业学报*, 2018, 34(4): 127-132.
- [8] 武立丹. 茄子栽培技术[J]. *吉林农业*, 2016(17): 64.
- [9] NINO-MEDINA G, URÍAS-ORONA V, MUY-RANGEL M D, et al. Structure and content of phenolics in eggplant (*Solanum melongena*)-a review[J]. *South African Journal of Botany*, 2017, 111: 161-169.
- [10] 卓丽. 茄子高产栽培技术[J]. *现代农业科技*, 2010(11): 111.

- [11] 吴和性,袁建明,李长根. 茄子高产栽培技术[J]. 安徽农学通报,2011,17(10):182-183.
- [12] 李威,肖熙鹫,吕玲玲. 高温胁迫下茄子耐热性表现及耐热指标的筛选[J]. 热带作物学报,2015,36(6):1142-1146.
- [13] 赵雪,罗英,王志敏,等. 高温胁迫对茄子影响的研究进展[J]. 长江蔬菜,2014(20):8-11.
- [14] LIU Y, TIKUNOV Y, SCHOUTEN R E, et al. Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in solanaceous vegetables; a review[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2018, 6:52.
- [15] 吴翠平. 光照对紫马铃薯块茎花青素合成及品质的影响[D]. 雅安:四川农业大学,2016.
- [16] ZHANG S M, ZHANG A D, WU X X, et al. Transcriptome analysis revealed expression of genes related to anthocyanin biosynthesis in eggplant (*Solanum melongena* L.) under high-temperature stress[J]. *BMC plant biology*, 2019, 19(1):387.
- [17] 李金弟. 颠茄 qPCR 内参基因筛选及 TR II 基因表达分析[D]. 重庆:西南大学,2013.
- [18] KENNETH J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*. 2001, 25:402-408.
- [19] 牡丹妮,张超,高树林. 低温对牡丹切花花色和花青素苷合成的影响[J]. 植物遗传资源学报,2016,17(2):295-302.
- [20] 罗兰. 彩叶草叶片呈色的生理特性及其花色苷性质研究[D]. 重庆:西南大学,2007.
- [21] YAMANE T, JEONG S T, GOTO-YAMAMOTO N, et al. Effects of temperature on anthocyanin biosynthesis in grape berry skins[J]. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2006, 57:54-59.
- [22] 李卫东,梁慧珍,卢为国,等. 大豆籽粒异黄酮含量与生态因子相关关系的研究[J]. 中国农业科学,2004,37(10):1458-1463.
- [23] 常丽. 温度和土壤水分对银杏叶类黄酮合成的影响[D]. 南京:南京林业大学,2013.
- [24] 郝向阳,孙雪丽,王天池,等. 植物 PAL 基因及其编码蛋白的特征与功能研究进展[J]. 热带作物学报,2018,39(7):199-208.
- [25] 吴雪霞,张爱冬,朱宗文,等. 高温胁迫对茄子果皮活性氧代谢、花青素及其主要合成酶的影响[J]. 江西农业学报,2018,30(6):1-5.
- [26] PAN Q, ZHN J, LIU H, et al. Salicylic acid synthesized by benzoic acid 2-hydroxylase participates in the development of thermotolerance in pea plants[J]. *Plant Science*, 2006, 171(2):226-233.
- [27] 陈雷,常丽,曹福亮,等. 银杏叶黄酮类化合物含量及相关酶活性对温度和干旱胁迫的响应[J]. 西北植物学报,2013,33(4):755-762.
- [28] ZHANG X H, ZHENG X T, SUN B Y, et al. Over-expression of the *CHS* gene enhances resistance of *Arabidopsis* leaves to high light[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2018, 154:33-43.
- [29] 周发俊,王逸群,陈由强. 植物查尔酮异构酶分子生物学研究进展(综述)[J]. 河北科技师范学院学报,2008,22(1):73-77.
- [30] 刘金花. 环境因子对黄芩植株代谢的影响[D]. 济南:山东中医药大学,2011.
- [31] 庄维兵,刘天宇,束晓春,等. 植物体内花青素苷生物合成及呈色的分子调控机制[J]. 植物生理学报,2018,54(11):1630-1644.
- [32] 李云萍. 紫心甘薯 [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] 花色苷的积累与合成酶活性的关系研究[D]. 重庆:西南大学,2010.
- [33] 李小兰,张明生,吕亨. 植物花青素合成酶 ANS 基因的研究进展[J]. 植物生理学报,2016,52(6):817-827.
- [34] 李智. 不同环境因子调控茶树紫色芽叶形成的分子机制研究[D]. 泰安:山东农业大学,2014.
- [35] HUH E J, SHIN H K, CHOI S Y, et al. Thermosusceptible developmental stage in anthocyanin accumulation and color response to high temperature in red chrysanthemum cultivars[J]. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology*, 2008, 26(4):357-361.
- [36] MORI K, SUGAYA S, GEMMA H. Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition[J]. *Scientia Horticulturae*, 2005, 105(3):319-330.
- [37] 胡可,韩科厅,戴思兰. 环境因子调控植物花青素苷合成及呈色的机理[J]. 植物学报,2010,45(3):307-317.
- [38] ISLAM M S, JALALUDDIN M, GARNER J O, et al. Artificial shading and temperature influence on anthocyanin compositions in sweet potato leaves[J]. *HortScience*, 2005, 40(1):176-180.

(责任编辑:郭娇)