

转录组学联合代谢组学揭示低温对婆婆纳活性成分积累的调控机制

金敏睿¹, 苏衍龙², 周香艳^{1*}, 栗孟飞^{1,2*}

1. 甘肃农业大学生命科学技术学院, 甘肃 兰州 730070

2. 甘肃农业大学农学院 干旱生境作物学国家重点实验室, 甘肃 兰州 730070

摘要: **目的** 研究低温处理对婆婆纳 *Veronica polita* 活性成分积累的影响, 并阐明其调控机制。 **方法** 对经低温处理的婆婆纳进行表型观察、生理生化指标测定、转录组及代谢组分析。 **结果** 随着低温处理时间的延长, 婆婆纳的株高、鲜质量、干质量, 以及根长均显著增加。超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和过氧化物酶 (peroxidase, POD) 活性、总黄酮、总酚及总糖含量均先升高后降低, 丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、叶绿素含量及过氧化氢酶 (catalase, CAT) 活性增加, 叶绿素荧光参数降低。转录组分析显示, 差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 呈阶段特异性表达模式: 次生代谢物生物合成、苯丙烷类生物合成、代谢途径、植物激素信号转导等通路 DEGs 显著富集; 筛选出 3 个黄酮类合成相关基因 (*GT5*、*JOX2*、*HOI*) 和 5 个酚类物质合成与代谢相关基因 (*LAC3*、*AOX4*、*LPR2*、*ASI*、*MT-CO2*)。代谢物中槲皮素、杨梅素和苯甲酸含量随着处理时间延长, 呈先升高后降低的趋势。整合多组学分析揭示, 婆婆纳响应低温的机制主要为苯丙烷/类黄酮代谢通路的调控。 **结论** 适度低温处理有助于婆婆纳次生代谢物的积累, 为其功能基因的深入研究奠定了基础。

关键词: 婆婆纳; 低温处理; 生理指标; 转录组; 代谢组; 槲皮素; 杨梅素; 苯甲酸

中图分类号: R282.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)11-4351-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.11.022

Revealing regulatory mechanism of low-temperature on accumulation of active components in *Veronica polita* based on transcriptome and metabolome

JIN Minrui¹, SU Yanlong², ZHOU Xiangyan¹, LI Mengfei^{1,2}

1. College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

2. College of Agronomy & State Key Lab of Aridland Crop Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: Objective To investigate the regulatory mechanism underlying the effect of low-temperature treatment on the accumulation of active components in *Veronica polita* and clarify its regulatory mechanism. **Methods** Plants subjected to low-temperature treatment were analyzed through phenotypic observation, physiological and biochemical indices, transcriptome and metabolome analyses. **Results** Prolonged low-temperature treatment significantly increased the plant height, fresh weight and dry weight, as well as the root length of *V. polita*. The activities of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD), as well as the contents of total flavonoids, total phenols and total sugars first rose and then decreased. The contents of malondialdehyde (MDA) and chlorophyll increased, whereas chlorophyll fluorescence parameters decreased. The contents of total flavonoids and total phenols also first increased and then decreased. Transcriptomic analysis showed that the differentially expressed genes (DEGs) exhibited a stage-specific expression patterns. Pathways such as secondary metabolite biosynthesis, phenylpropanoid biosynthesis, metabolic pathways, and plant hormone signal transduction were significantly enriched. Three flavonoid synthesis-related genes (*GT5*, *JOX2*, *HOI*) and five phenol synthesis and metabolism-related genes (*LAC3*, *AOX4*, *LPR2*, *ASI*, *MT-CO2*) were identified. Metabolomic analysis indicated that the contents of quercetin, myricetin, and benzoic acid showed a trend of first increasing and then decreasing with the extension of treatment time.

收稿日期: 2025-11-20

基金项目: 甘肃省自然科学基金重点项目 (25JRRA349); 国家现代农业产业技术体系 (CARS-21)

作者简介: 金敏睿 (2000—), 男, 甘肃兰州人, 硕士研究生, 主要从事生物技术育种方面研究。

Tel: 13893603207 E-mail: 1426257490@qq.com

*通信作者: 周香艳 (1983—), 女, 汉族, 副教授, 博士, 研究方向为药用植物逆境生理与分子生物学。

Tel: 13893497565 E-mail: zhouxy@gsau.edu.cn

栗孟飞 (1980—), 男, 汉族, 教授, 博士, 研究方向为药用植物品种选育、标准化栽培及代谢产物调控。

Tel: 15565968269 E-mail: lmf@gsau.edu.cn

Integrated multi-omics analysis demonstrated that the core mechanism by which *V. polita* responds to low-temperature stress involves the precise reprogramming of the phenylpropanoid/flavonoid metabolic pathway. **Conclusion** Appropriately low-temperature treatment promotes the accumulation of secondary metabolites in *V. polita*, thereby providing a foundation for further research into its functional genes.

Key words: *Veronica polita* Tenore; low-temperature stress; physiological indices; transcriptome; metabolome; quercetin; myricetin; benzoic acid

婆婆纳 *Veronica polita* Tenore 是一至二年生草本植物,原产于亚洲西南部,在世界上大部分地区种植^[1-3]。其主要分布于温带和寒带,少数产自热带地区。婆婆纳在藏药中称“冬那端赤”,以晒干或新鲜全草入药,具有清热、消炎、消肿、愈伤和止血抗炎和抗氧化的功效。目前,针对婆婆纳的研究多集中在药材特性和化学成分方面,而少有对其生理方面的研究^[4-6]。

研究表明,低温对中药材活性成分的影响呈现复杂的双向调控作用^[7]。一方面,适度低温可通过激活抗逆基因、调控相关酶系统,促进部分中药材中活性成分的积累^[8]。另一方面,极端或长期低温胁迫会对植物生长发育产生不利影响,抑制活性成分合成^[15-17]。研究发现,低温导致的结冰、细胞膜损伤及代谢速率下降,可能是抑制植物活性成分合成的重要原因^[18-20]。如葡萄叶片经低温(5℃)处理后,咖啡酸和阿魏酸含量降低,光合效率(F_v/F_m)下降,黄酮合酶活性受抑制。甜叶菊 *Stevia rebaudiana* 经5℃处理1个月后,光系统II(PSII)效率降低,甜菊糖苷含量下降,与碳代谢途径中相关酶[如蔗糖磷酸合成酶(sucrose phosphate synthase, SPS)]活性受抑制有关^[21-24]。

黄酮类和酚类物质合成通过多种机制调控,在植物适应低温胁迫过程中发挥关键作用^[25-27]。黄酮类物质作为一类结构多样的多酚化合物,可通过清除活性氧(reactive oxygen species, ROS)、降低膜脂过氧化程度发挥强效抗氧化作用,从而在低温环境下维持植物细胞完整性^[28]。例如,低温胁迫可诱导辣椒叶片中木犀草素糖苷积累,与辣椒抗氧化能力增强呈正相关^[29-30]。在水稻 *Oryza sativa* L. 中,尿苷二磷酸糖基转移酶可通过对黄酮类物质进行糖基化修饰,增强水稻的抗冻性,进而提升其 ROS 清除能力及脱落酸(abscisic acid, ABA)介导的胁迫响应^[31]。此外,黄酮类物质还可通过与 *MYB*、*bHLH* 等转录因子相互作用调控基因表达,而这些转录因子能调节冷响应蛋白及次生代谢物的生物合成^[32-33]。酚类物质则通过提高抗氧化酶活性及

稳定细胞膜,增强植物的抗寒性^[34-36]。低温胁迫可激活酚类物质生物合成的关键酶—苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL),从而诱导植物体内酚类物质积累^[37-38]。

研究证实黄酮类与总酚类物质具有协同作用:低温胁迫下,番茄通过积累酚类和黄酮类物质激活抗氧化防御系统,以上2类物质的总量及单位含量均高于对照^[39]。以上结果表明,酚类代谢物在整合植物抗氧化防御、代谢调控及激素信号传导,以减轻低温诱导的损伤方面具有重要意义^[40-41]。

本实验以婆婆纳为材料,进行低温处理后,分别采集不同处理时间下的婆婆纳地上和地下部分,观察其表型的变化;测定丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量、抗氧化酶活性、总酚、总黄酮以及总糖含量;进行靶向代谢组学及转录组学分析,从分子水平揭示婆婆纳在低温处理下基因表达和活性成分积累调控模式,为深入研究婆婆纳功能基因奠定基础。

1 材料与仪器

供试婆婆纳种子由兰州鹏晨园农业专业合作社提供。实验所用的主要仪器包括:Agilent 1290-6460型超高效液相色谱-串联质谱联用仪(美国安捷伦公司),配备Agilent SB-C₁₈色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm),以及FD-1A-50型冷冻干燥机(北京博医康公司)、5810R型高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司)、VORTEX-5型涡旋混合器、ME204型万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多)、MM400型研磨仪(德国Retsch公司)和Milli-Q Direct超纯水系统(美国Millipore公司)。色谱级甲醇、乙腈及甲酸购自德国Merck或美国Sigma-Aldrich公司,对照品儿茶素(批号S18163)、洋蓟素(批号T97830)、槲皮素(批号A10009)、芦丁(批号A10008)、杨梅素(批号T98575)、绿原酸(批号A10016)、肉桂酸(批号A10178)、咖啡酸(批号T90124)、没食子酸(批号B20851)、芥子酸(批号B25310)、阿魏酸(批号B20007)、香草酸(批号B21361)、对羟基苯甲酸(批号

B72837)、苯甲酸(批号 A10168)、香豆酸(批号 T90258)、熊果酸(批号 A10061)均购于上海源叶生物科技有限公司,质量分数均≥98%,实验用水为实验室自制超纯水。

2 方法

2.1 样品的处理

选择婆婆纳颗粒饱满的种子,用清水浸泡 24 h,再用 600 mg/L 赤霉素浸泡 0.5 h,取出种子放入育苗盘中,覆土约 1 cm,放入 15 °C 培养箱中。待生长 1 个月后,将育苗盘中的幼苗移植到花盆中,在温度为 20 °C 的培养室中培养 30 d,在 10 °C 低温下处理,分别在处理 0、5、10 d 时(分别编号 V0、V5、V10),收集材料,每个处理设置 3 个重复,每个重复选取不同盆内的植株各 3 株,共 9 株(V0-1、V0-2、V0-3、V5-1、V5-2、V5-3、V10-1、V10-2、V10-3)。用于表型分析、生理指标测定、总黄酮、总酚含量、转录组以及代谢组分析。实验材料生长期均为 70 d,从而保证所用材料生长周期一致。

2.2 代谢物成分的测定^[1]

2.2.1 供试品溶液的制备 样品经液氮冷冻干燥后研磨成粉,准确称取 100 mg 粉末,加入 1.2 mL 70%甲醇水溶液(4 °C 预冷),涡旋混匀后每 30 min 振荡 30 s,共 6 次,于 4 °C 静置过夜,次日 12 000 r/min 离心 10 min,上清液过 0.22 μm 滤膜后进样检测^[1]。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取儿茶素、洋蓟素、槲皮素、芦丁、杨梅素、绿原酸、肉桂酸、

咖啡酸、没食子酸、芥子酸、阿魏酸、香草酸、对羟基苯甲酸、苯甲酸、香豆酸、熊果酸对照品适量,加 70%甲醇溶解并稀释定容于 10 mL 量瓶中,分别制成各成分质量浓度均为 1.0 mg/mL 的混合对照品储备液。

2.2.3 色谱条件 Agilent SB-C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm),流动相 A 为 0.1%甲酸水、B 为 0.1%甲酸乙腈,进样量 4 μL,梯度洗脱,0~9 min, 5%~95% B; 9~10 min, 95% B; 10~11.1 min, 95%~5% B; 11.1~14.0 min, 5% B。体积流量 0.35 mL/min,柱温 40 °C。

2.2.4 标准曲线的绘制 各取混合对照品储备液,用 70%甲醇逐级稀释,得到儿茶素、洋蓟素、槲皮素、芦丁、杨梅素、绿原酸、肉桂酸、咖啡酸、没食子酸、芥子酸、阿魏酸、香草酸、对羟基苯甲酸、苯甲酸、香豆酸、熊果酸均为 1.0、5.0、10.0、50.0、100.0、200.0、500.0、2 000.0、5 000.0 ng/mL 的系列混合标准工作溶液,按“2.2.3”项下色谱条件进样分析,以各化合物的峰面积为纵坐标(Y),对应的质量浓度为横坐标(X),绘制标准曲线,计算回归方程和相关系数(R²)。各化合物线性关系良好(R²>0.990),见表 1。

2.2.5 方法学考察^[1] 稳定性、精密度、重复性、加样回收率结果显示,重复性试验中,取同一样品 6 份分别测定,各成分的质量分数 RSD 值均小于 5%;稳定性试验中,同一样品在 4 °C 下分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定,各成分峰面积的 RSD

表 1 线性方程及线性范围

Table 1 Linear equation and linear range

化合物	线性方程	R ²	线性范围/(ng·mL ⁻¹)
儿茶素	$Y=10\,421.97X-53.64$	0.999 97	1.024~40.000
槲皮素	$Y=0.450\,0X-19.990\,0$	0.999 56	128.000~5 000.000
芦丁	$Y=0.214\,3X-12.800\,0$	0.999 46	128.000~5 000.000
洋蓟素	$Y=0.069\,9X-6.270\,0$	0.998 36	128.000~5 000.000
杨梅素	$Y=0.450\,0X-19.990\,0$	0.999 56	128.000~800.000
没食子酸	$Y=0.396\,5X-20.530\,0$	0.999 08	128.000~5 000.000
咖啡酸	$Y=7\,922.02X+1\,596.23$	0.994 05	1.024~40.000
绿原酸	$Y=3\,882.04X-2\,053.00$	0.999 54	2.560~100.000
香草酸	$Y=2.320\,7X+99.34$	0.993 52	128.000~2 000.000
芥子酸	$Y=10\,595.25X+1\,596.36$	0.991 30	1.024~40.000
阿魏酸	$Y=13\,688.43X+56\,987.36$	0.992 37	1.024~40.000
肉桂酸	$Y=5\,899.70X+1\,230.06$	0.992 77	1.024~40.000
熊果酸	$Y=0.489\,1X-0.987\,6$	0.999 12	1.200~2 000.000
苯甲酸	$Y=1.754\,3X+2.345\,6$	0.998 76	1.2~2 000.000
4-羟基苯甲酸	$Y=2.876\,5X-1.234\,5$	0.997 89	128~2 000.000
香豆酸	$Y=3.210\,9X+0.876\,5$	0.996 54	1.024~40.000

均小于 6%，表明样品在 24 h 内稳定；日内精密度的 RSD 均小于 5%，日间精密度的 RSD 均小于 6%；各成分的加样回收率在 95.0%~101.5%，RSD 值在 0.50%~1.89%。以上结果说明本方法准确可靠，可用于婆婆纳叶片中目标代谢物的定量分析。

2.3 表型及生理生化指标测定

分别测定婆婆纳幼苗的株高、鲜质量和干质量，其中株高和根长用直尺测量，鲜质量和干质量用电子天平称量。将婆婆纳植株在 108 °C 下杀青 30 min，80 °C 烘干至恒定，称定为干质量。分别取 0.3 g 婆婆纳叶片，测定抗氧化酶活性[超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶 (peroxidase, POD) 和过氧化氢酶 (catalase, CAT)]。SOD 使用氮蓝四唑 (NBT) 法测定^[42]，POD 使用愈创木酚法测定^[43]，CAT 使用比色法测定^[44]。MDA 含量用代巴比妥酸法测定^[45]。可溶性糖使用硫酸苯酚法测定^[46]。总黄酮使用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠法测定，总酚使用福林酚试剂法测定^[47-48]。

2.4 低温胁迫下婆婆纳的转录组学分析

2.4.1 RNA 提取及 cDNA 文库建立 取适量经低温处理的婆婆纳叶片，加液氮研磨至粉末状，使用 Trizol 试剂盒 (Tiangen 公司) 进行总 RNA 提取。通过带有 Oligo (dT) 的磁珠富集具有 polyA 尾巴的真核 mRNA 后，用超声波把 mRNA 打断。以片段化的 mRNA 为模板，随机寡核苷酸为引物，在 M-MuLV 逆转录酶体系中合成 cDNA 第 1 条链，随后用 RNaseH 降解 RNA 链，并在 DNA polymerase I 体系下以 dNTPs 为原料合成 cDNA 第 2 条链。纯化后的双链 cDNA 经过末端修复、加 A 尾并连接测序接头，用 AMPure XP beads 筛选 200 bp 左右的 cDNA，进行 PCR 扩增并再次使用 AMPure XP beads 纯化 PCR 产物，最终获得文库。

2.4.2 数据质控及样本关系分析 为了保证数据质量，要在信息分析前对原始数据 (raw reads) 进行数据过滤，以减少无效数据所带来的分析干扰。首先，对 raw reads 利用 fastp 进行质控，过滤低质量数据，得到 clean reads。数据经过过滤后，分析碱基的组成及质量分布，以直观展示数据质量情况。针对每个样本的表达量，通过主成分分析 (principal component analysis, PCA)，了解样本间的重复性，辅助排除离群样本。

2.4.3 差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 的鉴定与分析 采用 DESeq2 软件进行差异

表达分析。当 $P < 0.05$ 且 $|\log_2 FC| \geq 2$ 时，确定为 DEGs。并进一步对 DEGs 进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。

2.4.4 qRT-PCR 验证 随机挑选 15 个基因进行荧光定量 PCR 分析，验证转录组数据。qRT-PCR 引物设计使用网站 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 完成，合成引物由上海生工生物工程股份有限公司完成，引物信息见表 2。参照天根生化科技 (北京) 有限公司提供的 FastReal 快速荧光定量试剂盒说明书进行，反应体系为 20 μ L，反应程序为预变性阶段 (95 °C、2 min，不采集荧光信号)、PCR 阶段 (95 °C、5 s，不采集荧光信号；60 °C、15 s，采集荧光信号)，总共 40 个循环。以 ACT7 基因作为内参，每个样本设置 3 个重复，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法计算基因的表达水平。

2.5 数据处理与统计分析

使用 SPSS 19.0 软件进行数据分析。对不同处理间的差异采用单因素方差分析 (ANOVA)，并用 Duncan's 法进行多重比较 ($P < 0.05$)。所有柱状图均使用 OriginPro 2021 软件绘制。

3 结果与分析

3.1 低温胁迫对婆婆纳幼苗生长发育和活性物质含量的影响

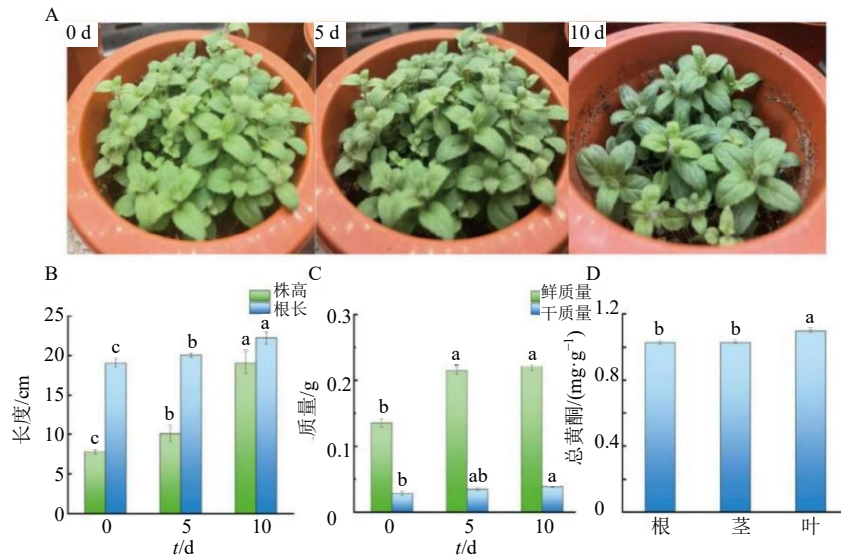
在低温处理下，婆婆纳叶片颜色加深，尤其在处理 10 d 时，叶片出现轻微皱缩，且有部分脱落 (图 1-A)。适度的低温能促进鲜质量和干质量的增加：与未处理植株相比，处理 10 d 时株高和根长均显著增加 (图 1-B)，处理 5 d 和 10 d 的鲜质量分别增加 1.59 倍和 1.63 倍，干质量呈逐渐上升趋势 (图 1-C)。低温处理后，比较不同组织中总黄酮含量，发现叶中的总黄酮含量最高，故后续实验以叶片为材料 (图 1-D)。

3.2 低温下婆婆纳生理生化指标的变化

低温下，叶片中总黄酮和总酚的含量在处理 5 d 时均达到峰值，分别较处理 0 d 时提高了 35.2% 和 28.7% (图 2-A、B)。可能是由于短期低温激活苯丙烷代谢通路，促进类黄酮与酚类物质的合成，从而增强抗氧化防御。随着处理时间的延长，叶绿素含量呈现出明显的上升趋势 (图 2-C)，而叶片 F_v/F_m 呈下降趋势 (图 2-D)。抗氧化系统中，POD 活性呈先升高后降低的趋势，处理 5 d 时达峰值，较 0 d 升高 42.3%；SOD 活性在处理 5 d 时较 0 d 降低约

表 2 qRT-PCR 引物序列
Table 2 Sequences of qRT-PCR primer

基因名称	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
<i>CYP81Q32</i>	TAGTCAATGCGTGGGCCATT	TATCAACGACCCTAGCCCCA
<i>GT5</i>	TCGAACGATGTGTCGGGTTT	GGCCATGCAATCATCGGAAC
<i>JOX2</i>	CCGAAAGTGCGTAAACACG	CTCGCGTAGGGTTTCATCGT
<i>HO1</i>	ATCCAGAACCGTCATCCCCCT	GCCTATCATCCTGCCACCAG
<i>ANS</i>	CGCGAAAACACTGAGAAGCC	CGGGTTGAGGACATATCGGG
<i>LAC3</i>	ACGACCAACGTCCCTTCTCAC	AATGCGGGAAGTGTAGGCAA
<i>AOX4</i>	CCTCCTAATACGCGACGACC	GATACGAGTGAGGTGAGCGG
<i>LPR2</i>	CGCGATCATAGTGAACGGGA	TCGGATGCCACATGGACAAA
<i>AS1</i>	AGCTCCAAGTCCACAACCTCG	ACGGCATTGCGAAAGTAGGA
<i>MT-CO2</i>	ACCTGGTGAACACTGACTGC	CTAGGGAGGGGACTGCTCAT
<i>NCED2</i>	GCTCCTGTACCTGAACACCC	ATCATGCCGTCACCATCGAA
<i>GA2OX1</i>	GGAGCTTGGGCTTGGAGAAA	GATCTGGGCATGGCGGATAA
<i>CYP71D55</i>	GGTACACCATCCCTGCGAAA	GCGCCAAGGTAATCTACGGA
<i>DET2</i>	CACTACACTCACCGCACACT	GCGAAAGCCGTTAATGCGAT
<i>IPT2</i>	CCTGTTATAGTGGGCGGGAC	TCGCAGGGTGTCTTACCAG
<i>ACT7</i>	CGTGGGTGATGAAGCTCAGT	CCTGGGATTGAGAGGAGCC



A-表型变化; B-株高和根长; C-鲜质量和干质量; D-不同组织中总黄酮含量; 不同字母表示不同处理之间存在显著差异 ($P < 0.05$), 下同。
A-phenotypic changes of *V. polita* after treatment; B-plant height and root length; C-fresh weight and dry weight; D-total flavonoid content in different tissues; Different letters indicate significant differences between different treatments ($P < 0.05$), same as below.

图 1 低温处理下婆婆纳幼苗表型及不同组织中总黄酮含量

Fig. 1 Phenotypic changes and total flavonoid content in different tissues of *Veronica polita* seedlings under low-temperature stress

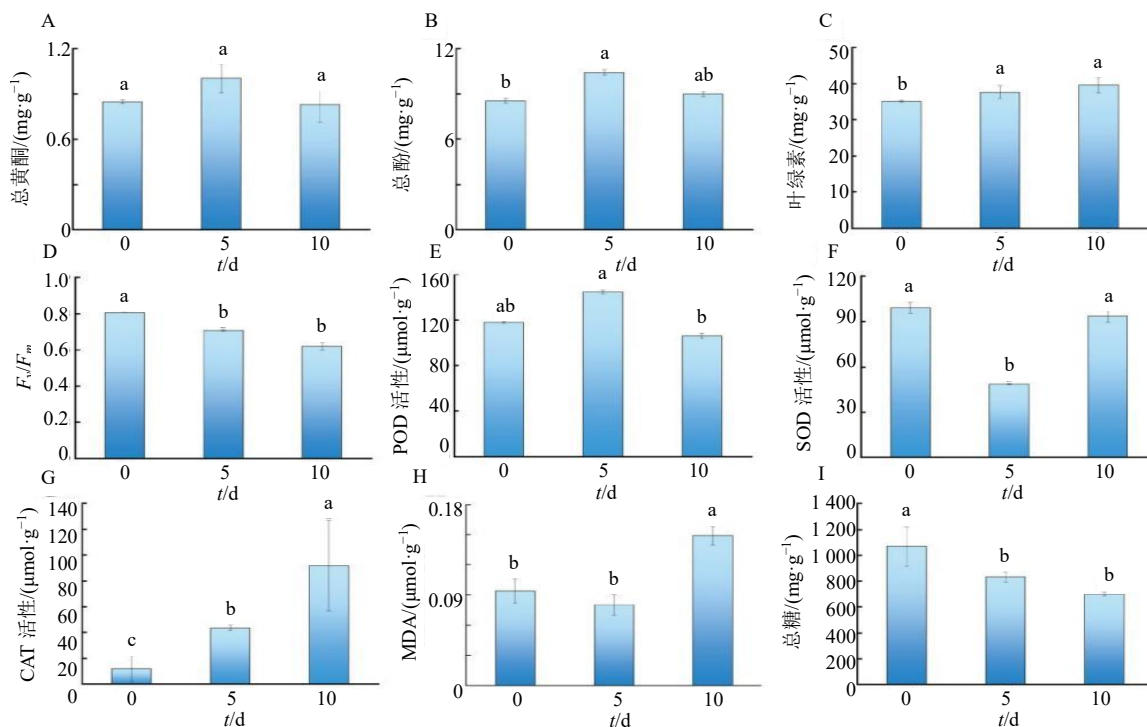
54.8%; 而 CAT 活性则持续升高, 处理 10 d 时较 0 d 提高 56.7% (图 2-E~G)。MDA 含量呈先降低后升高的趋势, 处理 5 d 时较 0 d 下降 15.2%, 处理 10 d 时又超过对照 22.4% (图 2-H), 反映了膜脂过氧化程度在长期胁迫下加剧。总糖含量呈逐渐下降趋势, 处理 10 d 时较 0 d 降低 31.5% (图 2-I), 可能与光合效率下降及呼吸消耗增加有关。

3.3 代谢物成分含量变化

不同处理时长下, 婆婆纳中 5 种黄酮类化合物(儿

茶素、洋蓟素、槲皮素、芦丁、杨梅素) 分析结果表明, 儿茶素含量随处理时间延长呈上升趋势, 洋蓟素则呈下降趋势, 芦丁、杨梅素和槲皮素含量随处理时间延长呈先升高后降低趋势, 与处理 0 d 相比, 处理 5 d 时这 3 种化合物的含量分别增加了 1.18、1.12 和 15.8 倍。对这 5 种黄酮类化合物的层次聚类分析显示, 芦丁、槲皮素与杨梅素具有相似的积累模式 (图 3)。

7 种酚类化合物中, 绿原酸在处理 5 d 时积累量最高。随处理时间延长, 肉桂酸含量先降低后增高, 而咖



A-总黄酮含量; B-总酚含量; C-叶绿素含量; D- F_v/F_m ; E~H-抗氧化酶活性和MDA含量; I-总糖含量。

A-total flavonoid content; B-total phenolic content; C-chlorophyll content; D- F_v/F_m ; E~H-antioxidant enzyme activity and MDA content; I-total sugar content.

图2 低温处理下婆婆纳活性物质和生理生化指标变化

Fig. 2 Changes in bioactive substances and physiological-biochemical indicators of *V. polita* under low temperature treatment



图3 低温处理下婆婆纳中黄酮类和酚类物质含量变化热图

Fig. 3 Heatmap of changes in flavonoid and phenolic contents in *V. polita* under low-temperature treatment

啡酸、没食子酸、芥子酸、阿魏酸和香草酸含量均呈上升趋势。层次聚类分析表明，咖啡酸、没食子酸、芥子酸、阿魏酸和香草酸具有相似的积累模式(图3)。

3.4 低温胁迫下婆婆纳的转录组学分析

3.4.1 转录组测序质量分析 对婆婆纳在低温处理

0、5、10 d后，进行 de novo 转录组测序。转录组测序数据已保存在 NCBI 数据库中 (PRJNA1376212)。各处理获得的 raw reads 在 6 244 062 600~8 528 677 200 对，测序数据的预处理包括去除包含接头污染的 reads、未知碱基 N 含量大于 5% 的 reads 以及平均质量值低于 Q_{20} 的 reads，最终获得的 clean reads 分布范围在 6 024 815 063~8 192 029 032 对(表3)。

3.4.2 转录组学分析 婆婆纳转录组测序及组装获得的单基因，与白花泡桐 *Paulownia fortunei* 的同源性最高，相似性为 25.9%；其次是钓钟柳 *Penstemon davidsonii* 和互叶醉鱼草 *Buddleja alternifolia*，相似性分别为 9.5%和 7%。婆婆纳同源序列比对的植物物种分布图见图 4-A。对各时间点的 DEGs 进行统计：低温处理下，与 V0 相比，V5 时婆婆纳的上调基因数量为 974 个，下调基因数量为 933 个；与 0 d 相比，10 d 时上调基因数量为 1 088 个，下调基因数量为 2 033 个。在 V0 vs V5 和 V0 vs V10 比较中，共同上调的差异表达基因有 568 个，共同下调的差异表达基因有 714 个(图 4-B)。

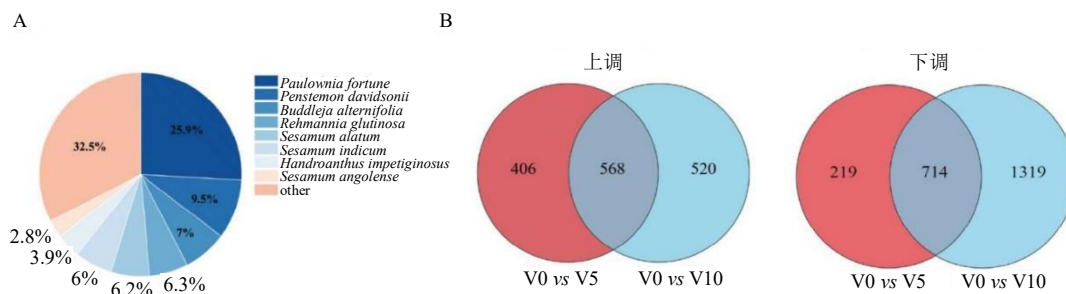
表 3 转录组测序数据统计

Table 3 Statistics of sequencing data of transcriptome

样品	raw reads	clean reads	Q ₂₀ /%	Q ₃₀ /%	GC/%
V0-1	6 694 123 800	6 517 016 768	98.44	95.30	44.78
V0-2	6 244 062 600	6 024 815 063	98.51	95.54	44.73
V0-3	7 608 174 300	7 374 307 537	98.52	95.55	44.88
V5-1	6 433 289 100	6 248 535 399	98.52	95.57	44.51
V5-2	7 007 107 500	6 781 930 777	98.42	95.26	44.44
V5-3	8 528 677 200	8 192 029 032	98.52	95.61	44.56
V10-1	7 433 425 200	7 195 480 621	98.66	95.94	44.57
V10-2	7 427 524 500	7 236 803 695	98.64	95.90	44.67
V10-3	7 093 845 000	6 858 451 181	98.62	95.87	44.70

raw reads 指下机原始 reads 数目; clean reads 指高质量 reads 数目; Q₂₀ 指所有碱基中 Q 值大于 20 的碱基比例; Q₃₀ 指所有碱基中 Q 值大于 30 的碱基比例; GC 为碱基 G 和 C 的数目占总碱基的百分比。

raw reads refers to the number of original reads. clean-reads refers to the number of high quality reads. Q₂₀ refers to the proportion of all bases with a Q value greater than 20; Q₃₀ refers to the proportion of all bases with a Q value greater than 30; GC refers to the percentage of the number of bases G and C in the total base.



A-婆婆纳同源序列比对的植物物种分布图; B-上调和下调的 DEGs 韦恩图。

A-distribution map of plant species for homologous sequence alignment of *V. polita*; B-venn diagram of Up- and down-DEGs.

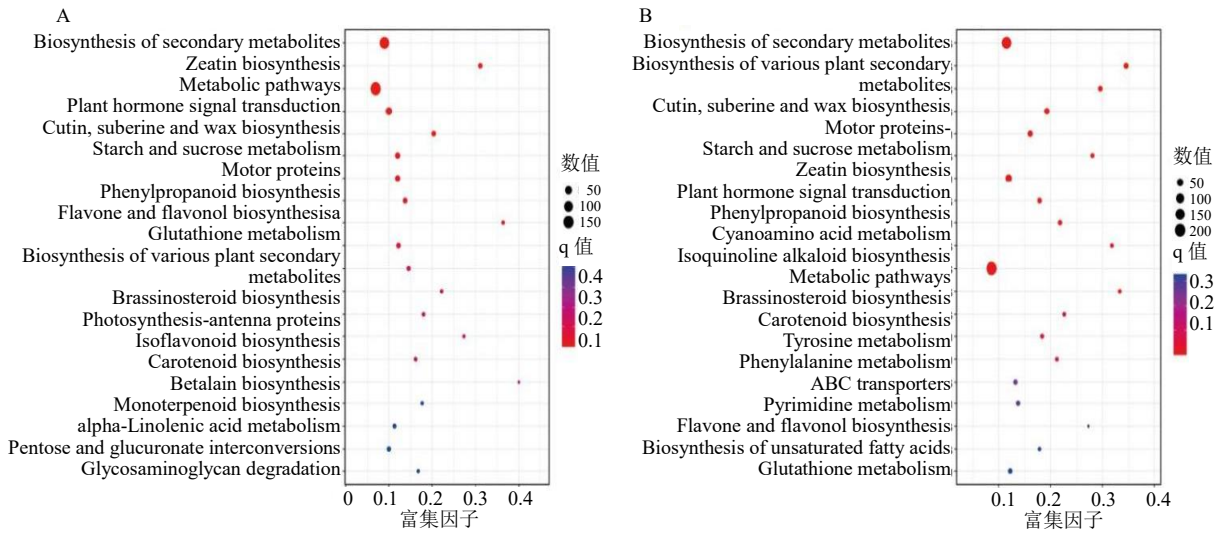
图 4 不同时间低温处理下婆婆纳 DEGs 分析

Fig. 4 DEGs analysis of *V. polita* under low temperature treatment at different time points

GO 分析显示主要包括生物学过程 (biological process)、细胞组成 (cellular component) 和分子功能 (molecular function) 3 大类。将 V0 vs V5 和 V0 vs V10 2 个组对比分析,发现共同富集到生物过程类别中的代谢过程和细胞过程,细胞组分类别中的细胞和细胞部分,分子功能中的催化活性和分子结合,且这些共同富集过程中的 DEGs 数目均随着低温处理时间的延长而减少;另外富集在生物过程中的细胞过程 (cellular process),细胞组分中的细胞解剖实体 (cellular anatomical entity),分子功能中的结合 (binding) 以及催化活性 (catalytic activity) 均随着低温处理时间的延长,DEGs 数目呈现先升高后下降的趋势。

为了进一步了解这些 DEGs 的功能,对 DEGs 进行 KEGG 富集分析。婆婆纳低温处理 5 d 和 10 d 与对照组相比,图 5 中显示了富集程度高的前 20 条

通路,其中婆婆纳在低温处理 5 d 时,显著富集的通路是次生代谢物的生物合成 (biosynthesis of secondary metabolites),富集程度较高的是苯丙烷类生物合成 (phenylpropanoid biosynthesis),代谢途径 (metabolic pathways),植物激素信号转导 (plant hormone signal transduction),其中代谢途径富集最多,有 202 个 DEGs (图 5-A);婆婆纳在低温处理 10 d 时最显著富集的通路是次生代谢物的生物合成 (biosynthesis of secondary metabolites) 以及代谢途径 (metabolic pathways),其次为光合作用-天线蛋白,光合生物中的碳固定 (carbon fixation in photosynthetic organisms),淀粉和蔗糖代谢 (starch and sucrose metabolism),有 250 个 DEGs (图 5-B);婆婆纳在 V0 vs V5 和 V0 vs V10 对比组中最显著富集的是代谢途径、苯丙烷类生物合成,富集最多的也为代谢途径。



A-V0 vs V5 差异基因 KEGG 富集分析; B-V0 vs V10 差异基因 KEGG 富集分析。

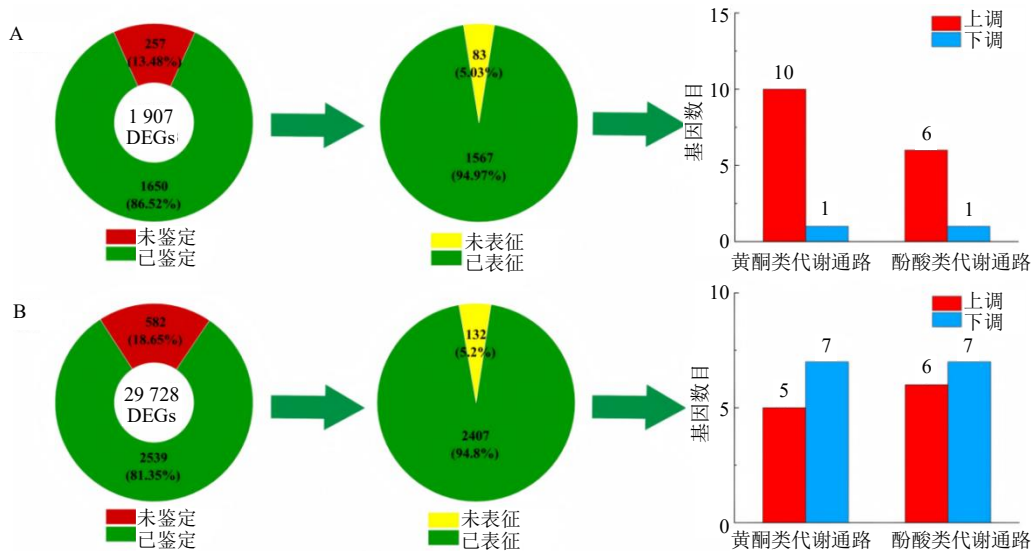
A-KEGG analysis of DEGs associated with the identified biomarkers for V0 vs V5; B-KEGG analysis of DEGs associated with the identified biomarkers for V0 vs V10.

图 5 低温处理下婆婆纳中 DEGs 功能富集分析

Fig. 5 Functional enrichment analysis of DEGs in *V. polita* under low-temperature treatment

在 V0 vs V5 对比组中, 有 1 907 个 DEGs, 其中有 257 个在 SwissProt、KOG、GO 或 KEGG 数据库未鉴定。在已鉴定的 1 650 个 DEGs 中, 1 567 个具有生物学特性, 83 个尚无生物学特性; 对具有生物学特性的 DEGs 分析发现参与类黄酮代谢的相关基因有 11 个 (10 个上调、1 个下调), 酚酸类代谢相关基因有 7 个 (6 个上调、1 个下调) (图 6-A);

在 V0 vs V10 对比组中, 有 29 728 个 DEGs, 其中有 582 个在 SwissProt、KOG、GO 或 KEGG 数据库未鉴定。在已鉴定的 2 539 个 DEGs 中, 2 407 个具有生物学特性, 132 个尚无生物学特性; 对具有生物学特性的 DEGs 分析发现参与类黄酮代谢的相关基因有 12 个 (5 个上调、7 个下调), 酚酸类代谢相关基因有 13 个 (6 个上调、7 个下调) (图 6-B)。



A-V0 vs V5 中黄酮类和酚酸类代谢相关 DEGs; B-V0 vs V10 中黄酮类和酚酸类代谢相关 DEGs。

A-DEGs related to flavonoid and phenolic acid metabolism in V0 vs V5; B-DEGs related to flavonoid and phenolic acid metabolism in V0 vs V10.

图 6 低温不同处理时间下婆婆纳的 DEGs 分类和代谢相关基因统计

Fig. 6 Classification of DEGs and metabolism-related genes in *V. polita* under low-temperature treatment

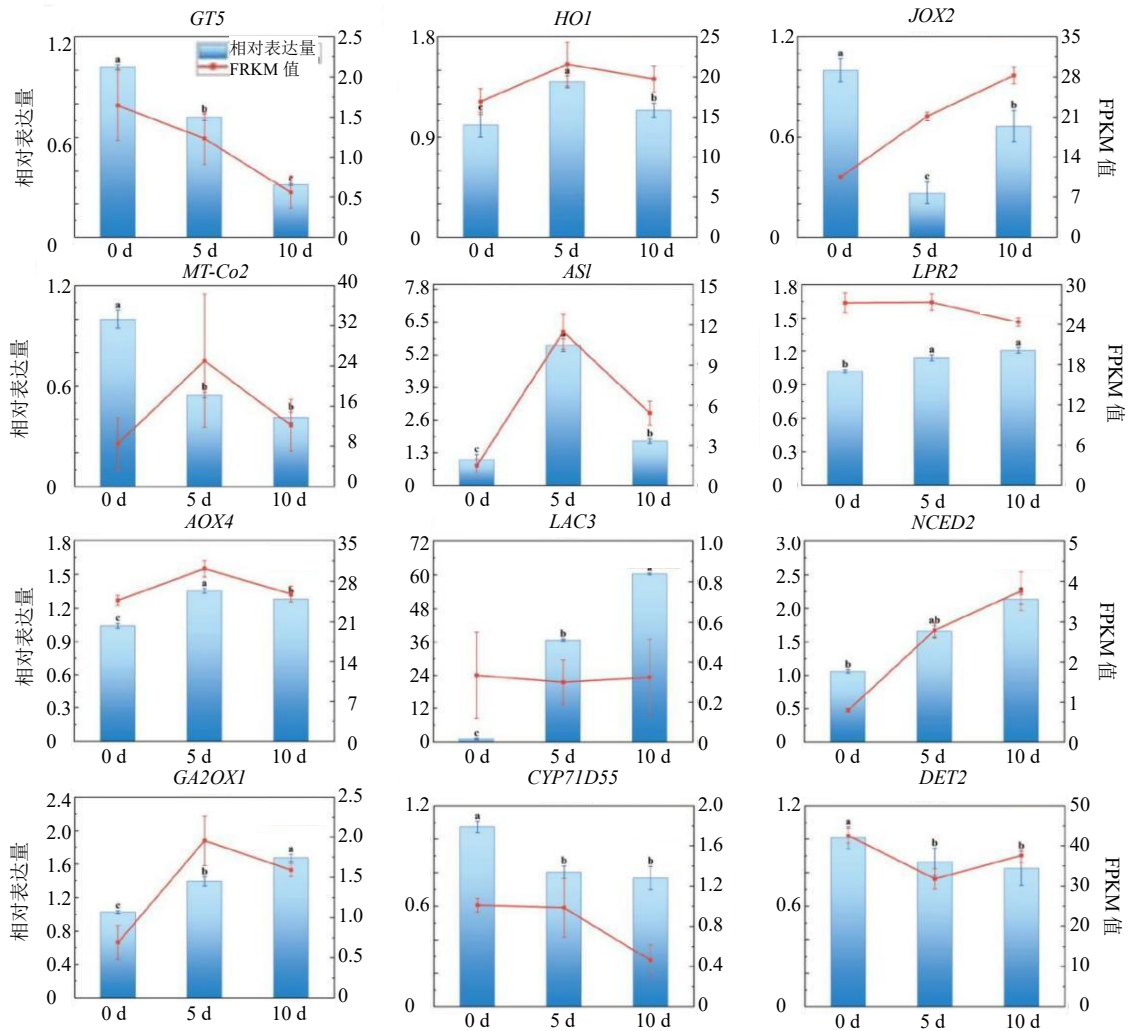
3.4.3 转录组数据 qRT-PCR 验证 为了验证转录组数据，从 DEGs 中随机筛选出 12 个基因，其中黄酮类化合物合成途径及信号通路相关基因 3 个 (*GT5*、*JOX2*、*HO1*)，酚类化合物合成途径及信号通路相关基因 4 个 (*LAC3*、*AOX4*、*LPR2*、*ASI*、*MT-CO2*)，以及萜类化合物合成途径及信号通路相关基因 5 个 (*NCED2*、*GA2OX1*、*CYP71D55*、*DET2*)。并通过 DEGs 的 FPKM 值绘制热图，发现不同基因在低温处理下的表达模式差异明显。如 *JOX2* 基因在低温处理下先下降后上升；而 *LPR2* 基因在 0 d 时表达量较低，在 5 d 和 10 d 时表达量有所升高，表明其表达受到低温胁迫的诱导。不同样本之间也存在基因表达的差异，低温胁迫下大部分基因相对表达量显著增加，表明随着低温处理时间的延长，婆婆纳中更多基因的表达被激活，响应

低温环境。

qRT-PCR 显示，与黄酮类化合物合成途径及信号通路相关的基因 (*HO1*) 表达量在低温处理 5 d 时达到峰值，3 个基因呈下降趋势；与酚类化合物合成途径及信号通路相关的 2 个基因 (*ASI*、*AOX4*) 表达量在低温胁迫 5 d 时达到峰值；与萜类化合物合成途径及信号通路相关的 2 个基因 (*NCED2*、*GA2OX1*) 呈上升趋势，3 个基因呈下降趋势。结果表明，这些变化趋势与转录组测序结果基本一致 (图 7)。因此，本研究中转录组测序的结果是可靠的。

3.5 低温处理下婆婆纳代谢途径分析

本研究通过多组学整合分析揭示，婆婆纳响应低温处理的核心机制在于对苯丙烷/类黄酮代谢路的精确重编程。短期处理 (5 d) 通过显著上调



折线图代表转录组数据中的 FPKM 值，柱状图代表 qRT-PCR 中通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算得到的基因相对表达量。

The line chart shows the FPKM values from RNA-seq data, and the bar chart represents the qRT-PCR results calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

图 7 qRT-PCR 与转录组中基因表达水平比较

Fig. 7 Comparison of gene expression levels between qRT-PCR and transcriptome

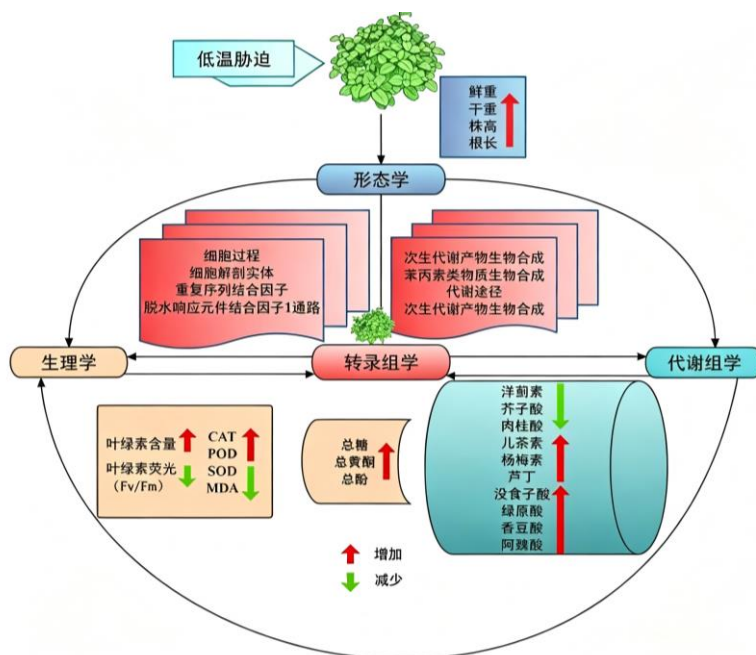


图9 婆婆纳对低温处理的响应模式

Fig. 9 Response pattern of *V. polita* to low-temperature treatment

另一方面，当低温胁迫时间延长时，会对植物产生不利影响。尽管 CAT 活性持续升高，但 SOD 和 POD 活性在 10 d 时出现回落，MDA 含量回升，表明长期的氧化胁迫已开始对细胞膜系统造成损伤。转录组数据显示，与 5 d 相比，10 d 时参与类黄酮和酚酸代谢的 DEGs 中下调基因的数量显著增加。例如，类黄酮代谢相关基因从 5 d 时的 10 个上调、1 个下调，转变为 10 d 时的 5 个上调、7 个下调。这种基因表达模式的转变直接导致了部分代谢物（如洋茴素、芦丁、杨梅素和槲皮素）含量在 10 d 时下降。这种因胁迫持续时间延长而从激活转向抑制的现象，与甜叶菊和葡萄的研究结果一致。在甜叶菊中，长期低温导致 PSII 效率降低，并抑制了 SPS 的活性，进而导致甜菊糖苷含量下降；在葡萄中，低温处理降低了咖啡酸和阿魏酸的含量，并抑制了黄酮合酶的活性^[21-24]。本研究中 F_v/F_m 的持续下降以及“光合作用-天线蛋白”和“碳固定”通路在 10 d 时显著富集，进一步证实长期低温可能破坏了婆婆纳的光合系统，限制了碳骨架和能量向次生代谢的供给，最终抑制了部分活性成分的合成^[46-47]。

KEGG 富集分析揭示了婆婆纳响应低温的关键代谢通路。苯丙烷生物合成途径在 5 d 和 10 d 均被显著富集，该途径是黄酮类和酚类物质合成的上游途径。这表明婆婆纳与拟南芥、水稻等模式植物

类似，通过核心的苯丙烷代谢途径来协调次生代谢以应对环境胁迫。其中，PAL 是此途径的限速酶，其活性常受低温诱导^[53]。本研究虽未直接测定 PAL 活性，但检测到多个酚酸类物质（如咖啡酸、没食子酸、阿魏酸）含量的持续上升，且酚酸代谢相关基因在 5 d 时以上调为主，提示 PAL 活性可能在短期胁迫中被激活。这些酚类物质不仅能直接抗氧化，如小麦中的木犀草素 C-糖苷和羟基肉桂酰胺在质外体积聚以抵抗氧化损伤，还可能通过与植物激素（如 ABA）信号互作来精细调控胁迫响应。此外，本研究在转录组中鉴定到的关键基因（如 ANS、LAC3 等）及其表达模式，为阐明婆婆纳中黄酮酚类物质合成的分子调控网络提供了重要线索。值得注意的是，低温胁迫下婆婆纳的地上部分生物量（鲜质量和干质量）以及株高均有所增加，这是一种典型的“低温驯化”现象^[54]。植物可能会将更多资源分配给生长和防御，以适应胁迫环境。然而，总糖含量的下降趋势表明，光合碳同化可能不足以满足生长和防御的双重能量需求，这可能是导致长期胁迫下部分次生代谢受阻的原因之一。

本研究鉴定出的多个关键基因功能有待进一步研究。例如，编码花色苷合成酶（anthocyanidin synthase, ANS）是黄酮途径下游的关键基因，其表达模式与芦丁、槲皮素的积累趋势高度相关，其显著上调可能直接促进了这些抗逆黄酮的合成。而

NCED2(编码9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶)是ABA生物合成的关键限速酶,其上调暗示ABA信号通路在婆婆纳低温驯化中被激活^[55]。有文献报道ABA作为重要的胁迫激素,能够通过调控一系列转录因子(如MYB、bHLH)激活冷响应基因(如CBFs)及下游次生代谢物的生物合成。例如,在丹参中,ABA处理能够显著诱导酚酸类成分的积累。因此,推测婆婆纳中可能存在ABA-NCED2-MYB/bHLH-苯丙烷途径的调控模块,介导了低温胁迫下的活性成分积累^[56-57]。

综上所述,低温首先引发光合效率下降和氧化胁迫,进而激活抗氧化酶系统和苯丙烷代谢通路,通过上调关键基因的表达,促进具有抗氧化功能的黄酮类和酚类物质的生物合成,从而增强植株的耐受性。本研究从生理-代谢-分子3个层面揭示了婆婆纳的低温响应机制,为提高婆婆纳药材质量提供了重要的理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wang Y X, Hu Y, Chen B H, et al. Physiological mechanisms of resistance to cold stress associated with 10 elite apple rootstocks [J]. *J Integr Agric*, 2018, 17(4): 857-866.
- [2] 刘天乐, 朱田田, 晋玲, 等. 当归 AP2/ERF 转录因子家族鉴定及干旱胁迫下的表达分析 [J]. *中草药*, 2024, 55(14): 4849-4859.
- [3] 陈佳茜, 郭广洋, 谭新杰, 等. 连翘多胺氧化酶基因家族的鉴定及干旱和盐胁迫下的表达分析 [J]. *中草药*, 2024, 55(9): 3077-3084.
- [4] Manasa S L, Panigrahy M, Panigrahi K C S, et al. Overview of cold stress regulation in plants [J]. *Bot Rev*, 2022, 88(3): 359-387.
- [5] Ding Y L, Shi Y T, Yang S H. Advances and challenges in uncovering cold tolerance regulatory mechanisms in plants [J]. *New Phytol*, 2019, 222(4): 1690-1704.
- [6] Székely Á, Szalóki T, Lantos C, et al. Data of selected set of rice accessions at the germination stage under cold stress [J]. *Data Brief*, 2022, 41: 107929.
- [7] 李佳荫, 冯国军, 刘大军, 等. 低温胁迫对菜豆种子吸胀期间生理特性和发芽能力的影响 [J]. *中国农学通报*, 2020, 36(1): 24-29.
- [8] 连艺佳, 刘瑞, 王嘉杰, 等. 低温对冬小麦萌发生理特性的影响 [J]. *北京农学院学报*, 2023, 38(4): 1-7.
- [9] 刘洋. 基于高通量测序分析灌浆初期低温对小麦颖果淀粉积累的影响 [D]. 扬州: 扬州大学, 2023.
- [10] Zhang T, Chen C B, Chen Y Q, et al. Changes in the leaf physiological characteristics and tissue-specific distribution of ginsenosides in *Panax ginseng* during flowering stage under cold stress [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 637324.
- [11] 马文琪, 王红阳, 张文晋, 等. 生态因子对人参外形和皂苷类成分的影响 2021, 46(8): 1920-1926.
- [12] Deng D Q, Fan J, Cao L, et al. Effect of low-temperature stress on secondary metabolism of *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongolicus* Hsiao [J]. *Russ J Plant Physiol*, 2024, 71(4): 105.
- [13] Abila M, Sun H G, Li Z Y, et al. Identification of miRNAs and their response to cold stress in *Astragalus membranaceus* [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(5): 182.
- [14] Daniell H, Lin C S, Yu M, et al. Chloroplast genomes: Diversity, evolution, and applications in genetic engineering [J]. *Genome Biol*, 2016, 17(1): 134.
- [15] Wicke S, Schneeweiss G M, DePamphilis C W, et al. The evolution of the plastid chromosome in land plants: Gene content, gene order, gene function [J]. *Plant Mol Biol*, 2011, 76(3): 273-297.
- [16] Egamberdiev S S, Saha S, Salakhutdinov I, et al. Comparative assessment of genetic diversity in cytoplasmic and nuclear genome of upland cotton [J]. *Genetica*, 2016, 144(3): 289-306.
- [17] Liu H X, Wang Y, Xu J, et al. Ethylene signaling is required for the acceleration of cell death induced by the activation of AtMEK5 in *Arabidopsis* [J]. *Cell Res*, 2008, 18(3): 422-432.
- [18] 冯汉青, 赵玲, 庞海龙, 等. 低温胁迫下交替呼吸途径对小麦幼根生长及氧化压力的调节作用 [J]. *西北师范大学学报: 自然科学版*, 2020, 56(4): 78-83.
- [19] 旦增曲培, 郭肖, 东知多杰, 等. 藏药巴夏嘎本草考证及同名异物形成原因分析 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2020, 22(10): 3746-3751.
- [20] 兰淑芝, 李伯清, 低温对植物的影响 [J]. *吉林农业*, 1997(8): 19-20.
- [21] Król A, Amarowicz R, Weidner S. The effects of cold stress on the phenolic compounds and antioxidant capacity of grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves [J]. *J Plant Physiol*, 2015, 189: 97-104.
- [22] Hajihashemi S, Noedoost F, Geuns J M C, et al. Effect of cold stress on photosynthetic traits, carbohydrates, morphology, and anatomy in nine cultivars of *Stevia rebaudiana* [J]. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 1430.
- [23] 晏方勤, 李晓, 焦坤, 等. 邻作婆婆纳对花生苗期主要害虫和天敌种群的影响 [J]. *花生学报*, 2022, 51(1): 23-29.
- [24] 李庚飞, 徐承. 婆婆纳对铅污染耐受性的研究 [J]. *北方园艺*, 2015(8): 70-73.
- [25] 赵云山, 毕雅琼, 雷露静, 等. “巴沙嘎”类蒙药品种整理与研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(5): 998-1004.
- [26] 王恒, 欧阳辉, 唐辉, 等. 婆婆纳的性状与显微鉴定 [J]. *中药材*, 2017, 40(2): 325-327.
- [27] 王莉娟, 张樱山, 马瑞瑞, 等. 藏药婆婆纳 HPLC 特征图谱的建立与主成分含量测定 [J]. *中兽医医药杂志*, 2022, 41(3): 17-22.

- [28] Barreira J C M, Dias M I, Živković J, *et al.* Phenolic profiling of *Veronica* spp. grown in mountain, urban and sandy soil environments [J]. *Food Chem*, 2014, 163: 275-283.
- [29] 许小涵, 唐志强, 刘谦, 等. 干旱胁迫下忍冬全基因组 DNA 甲基化和转录组分析 [J]. *中草药*, 2023, 54(16): 5339-5349.
- [30] Price J C, Udall J A, Bodily P M, *et al.* De novo identification of 'heterotigs' towards accurate and in-phase assembly of complex plant genomes [J]. *Internat Conferen Bioinformat Computat Biol*, 2012, 52: 26.
- [31] Tillich M, Lehwarck P, Pellizzer T, *et al.* GeSeq-versatile and accurate annotation of organelle genomes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(W1): W6-W11.
- [32] Zheng S Y, Poczai P, Hyvönen J, *et al.* Chloroplast: An online program for the versatile plotting of organelle genomes [J]. *Front Genet*, 2020, 11: 576124.
- [33] 孙晓琛, 栗锦鹏, 原静静, 等. 基于转录组测序分析干旱胁迫对党参不同组织基因表达的调控 [J]. *中草药*, 2022, 53(14): 4465-4475.
- [34] Amirousetfi A, Hyvönen J, Poczai P. IRscope: An online program to visualize the junction sites of chloroplast genomes [J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(17): 3030-3031.
- [35] Rentel M C, Lecourieux D, Ouaked F, *et al.* OX11 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 2004, 427(6977): 858-861.
- [36] Milne I, Lindner D, Bayer M, *et al.* TOPALi v2: A rich graphical interface for evolutionary analyses of multiple alignments on HPC clusters and multi-core desktops [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(1): 126-127.
- [37] Xu K, Zhao Y, Gu J, *et al.* Proteomic analysis reveals the molecular mechanism underlying the cold acclimation and freezing tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Plant Sci*, 2022, 318: 111242.
- [38] John Martin J J, Song Y Q, Hou M M, *et al.* Multi-omics approaches in oil palm research: A comprehensive review of metabolomics, proteomics, and transcriptomics based on low-temperature stress [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(14): 7695.
- [39] Junker B H, Lonien J, Heady L E, *et al.* Parallel determination of enzyme activities and *in vivo* fluxes in *Brassica napus* embryos grown on organic or inorganic nitrogen source [J]. *Phytochemistry*, 2007, 68(16/17/18): 2232-2242.
- [40] Yang X Y, Zhao T Y, Rao P, *et al.* Transcriptome profiling of *Populus tomentosa* under cold stress [J]. *Ind Crops Prod*, 2019, 135: 283-293.
- [41] Li Y Y, Wang X W, Ban Q Y, *et al.* Comparative transcriptomic analysis reveals gene expression associated with cold adaptation in the tea plant *Camellia sinensis* [J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 624.
- [42] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels [J]. *Anal Biochem*, 1971, 44(1): 276-287.
- [43] Chance B, Machly A C. *Assay of catalases and peroxidases* [M] Amsterdam: Elsevier, 1955: 764-775.
- [44] Aebi H. Catalase *in vitro* [M]// *Oxygen Radicals in Biological Systems*. Amsterdam: Elsevier, 1984, 105: 121-126.
- [45] Heath R L, Packer L. Reprint of: Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2022, 726: 109248.
- [46] DuBois M, Gilles K A, Hamilton J K, *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Anal Chem*, 1956, 28(3): 350-356.
- [47] Jia Z S, Tang M C, Wu J M. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals [J]. *Food Chem*, 1999, 64(4): 555-559.
- [48] Singleton V L, Rossi J A Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents [J]. *Am J Enol Vitic*, 1965, 16(3): 144-158.
- [49] Yun Z, Jin S, Ding Y D, *et al.* Comparative transcriptomics and proteomics analysis of *Citrus* fruit, to improve understanding of the effect of low temperature on maintaining fruit quality during lengthy post-harvest storage [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63(8): 2873-2893.
- [50] Xu G X, Li L J, Zhou J, *et al.* Comparison of transcriptome and metabolome analysis revealed differences in cold resistant metabolic pathways in different apple cultivars under low temperature stress [J]. *Hortic Plant J*, 2023, 9(2): 183-198.
- [51] Shahan R, Nolan T M, Benfey P N. Single-cell analysis of cell identity in the *Arabidopsis* root apical meristem: Insights and opportunities [J]. *J Exp Bot*, 2021, 72(19): 6679-6686.
- [52] Didovyk A, Borek B, Tsimring L, *et al.* Transcriptional regulation with CRISPR-Cas9: Principles, advances, and applications [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2016, 40: 177-184.
- [53] Guo Q Q, Li X, Niu L, *et al.* Transcription-associated metabolomic adjustments in maize occur during combined drought and cold stress [J]. *Plant Physiol*, 2021, 186(1): 677-695.
- [54] Li Q, Byrns B, Badawi M A, *et al.* Transcriptomic insights into phenological development and cold tolerance of wheat grown in the field [J]. *Plant Physiol*, 2018, 176(3): 2376-2394.
- [55] 孙国庆, 刘建雨, 吴发明, 等. 逆境胁迫下红花 CYP450s 基因的表达与幼叶总黄酮含量的相关性分析 [J]. *中草药*, 2022, 53(1): 222-230.
- [56] Wang P F, Dai L M, Ai J, *et al.* Identification and functional prediction of cold-related long non-coding RNA (lncRNA) in grapevine [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 6638.
- [57] Svensson J T, Crosatti C, Campoli C, *et al.* Transcriptome analysis of cold acclimation in barley *Albina* and xantha mutants [J]. *Plant Physiol*, 2006, 141(1): 257-270.