

## 采后黄瓜响应低温胁迫的转录组学分析

黄泳谚, 易景怡, 王 斌\*

韶关学院广东省粤北食药资源利用与保护重点实验室/韶关学院英东生物与农业学院, 广东韶关 512005

**摘要:** 采后黄瓜对低温敏感, 在低温贮藏期间很容易发生冷害, 会造成较大的采后损失。本研究采用转录组测序结合生物信息学分析的方法, 分析了采后黄瓜在短时冷害温度处理后的转录组变化。结果显示, 采后黄瓜在 5℃ 贮藏期间, 冷害指数和相对电导率逐渐增加, 叶绿素荧光逐渐降低, 表明采后黄瓜在 5℃ 贮藏期间产生了明显的冷害。与处理前相比 (0 h), 处理 12 h 导致 1500 个基因差异表达, 其中 706 个基因表达上调, 794 个基因表达下调。与 0 h 相比, 处理 72 h 导致 7799 个基因差异表达, 其中 3995 个基因表达上调, 3804 个基因表达下调。KEGG 富集结果显示, 低温处理导致的差异表达基因显著富集在植物激素信号转导、苯丙氨酸代谢、植物与病原菌互作和苯丙烷素合成途径中。GO 富集分析的结果显示, 在生物过程分类下, 差异表达基因主要参与以 DNA 为模板的转录调控、蛋白磷酸化和跨膜转运等过程; 在细胞组份分类下, 差异表达基因主要富集在细胞膜组份和细胞核; 在分子功能分类下, 差异表达基因主要与 ATP 结合、蛋白苏氨酸/丝氨酸激酶活性、DNA 结合和转录因子活性等功能有关。在低温处理 12 h 时, 与激素信号有关的基因显著表达。但在低温处理 72 h 时, 与植物-病原菌互作以及苯丙烷素合成有关的基因被显著诱导, 表明植物激素参与了早期的低温信号传递, 诱导病程相关基因表达以及苯丙烷素合成可能是采后黄瓜提高耐冷性, 应对低温胁迫的重要机制。本研究结果为采后黄瓜适应低温胁迫, 并对低温胁迫作出抗性的分子机理提供了新见解, 也为耐冷黄瓜新品种培育提供了重要基因资源。

**关键词:** 采后黄瓜; 冷害; 转录组分析; 植物激素信号; 苯丙烷素合成

中图分类号: S642.2 文献标识码: A

## Transcriptomic Analysis of Harvested Cucumber in Response to Cold Stress

HUANG Yongyan, YI Jingyi, WANG Bin\*

Guangdong Provincial Key Laboratory of Utilization and Conservation of Food and Medicinal Resources in Northern Region, Shaoguan University / Henry Fok College of Biology and Agriculture, Shaoguan University, Shaoguan, Guangdong 512005, China

**Abstract:** Harvested cucumber is sensitive to low temperature, which is subjected to chilling injury during cold storage and causes heavy postharvest losses. In this study, the method of RNA sequencing combined with bioinformatics analysis was used to analyze the transcriptomic changes of harvested cucumber when subjected to a short-term of cold treatment. The chilling injury index (CII) and relative electrical conductivity (REC) gradually increased but the chlorophyll fluorescence ( $F_v/F_m$ ) decreased with increasing time when stored at 5℃, indicating that the chilling injury was obviously occurred. Compared with that before treatment (0 h), treatment at 5℃ for 12 h resulted in 2679 differentially expressed genes (DEGs), of which 1194 DEGs were up-regulated and 1485 DEGs were down regulated. Compared with treatment for 0 h, treatment for 72 h resulted in 9494 DEGs, of which 4807 DEGs were up-regulated and 4687 DEGs were down regulated. The results of KEGG enrichment analysis showed that the DEGs caused by cold treatment were most significantly enriched in the pathways of plant hormone signal transduction, phenylalanine metabolism, plant pathway interaction and phenylpropanoid biosynthesis. The results of GO enrichment analysis showed that DEGs were

收稿日期 2022-03-28; 修回日期 2022-05-05

基金项目 广东省基础与应用基础研究基金项目 (No. 2022A1515011913)。

作者简介 黄泳谚 (2001—), 女, 本科生, 研究方向: 采后果蔬保鲜。\*通信作者 (Corresponding author): 王 斌 (WANG Bin), E-mail: b\_wang@sgu.edu.cn。

mainly involved in regulation of transcription DNA templated, protein phosphorylation and transmembrane transport in biological process. In cellular component, most enriched DEGs were related to organelle components such as membrane and nucleus. In molecular function, the enriched DEGs were mainly involved in ATP binding, protein serine/threonine kinase activity, DNA binding and transcription factor activity. DEGs related to hormone signal were significantly expressed when cucumber fruits were cold-treated for 12 h. However, the DEGs related to plant pathogen interaction and phenylpropanoid synthesis were significantly induced following 72 h of cold treatment. The results showed that plant hormone participated in the transmission of low temperature signals, the induced pathogenesis-related gene and phenylpropanoid biosynthesis might be important mechanisms for harvested cucumbers to improve chilling tolerance and cope with chilling stress. The results would provide new insights into the molecular mechanisms of harvested cucumber adaptation and resistance to chilling stress, and identify a lot of key gene resources for breeding cold-tolerant cucumber.

**Keywords:** harvested cucumber; chilling injury; transcriptomic analysis; plant hormone signal; phenylpropanoid biosynthesis

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.01.005

果蔬（水果和蔬菜的简称）采收后因脱离了母体，失去了养分供应来源，只能依靠自身贮存的营养物质维持正常的生命活动<sup>[1]</sup>。但采后果蔬仍是鲜活的生命体，各种生理代谢活动依然旺盛，在常温贮藏极易腐烂变质，导致营养物质流失甚至失去商品价值，会造成较为严重的经济损失和资源浪费<sup>[2]</sup>。在低温环境条件下，病原微生物的活动减弱，采后果蔬的呼吸作用强度下降，内源乙烯释放量减少。因此，低温贮运被认为是保持采后果蔬贮藏品质的最重要技术之一<sup>[3]</sup>。但是，许多原产于热带亚热带地区的果蔬，对低温特别敏感，在低温贮藏期间很容易发生冷害<sup>[4]</sup>，极大限制了低温贮运技术在这类果蔬中的推广应用。黄瓜（*Cucumis sativus* L.）是葫芦科黄瓜属植物，采后黄瓜对低温十分敏感，在低于 10℃ 的环境下贮藏时，即可产生明显的冷害症状<sup>[5]</sup>。发生冷害的采后黄瓜在货架期会腐烂变质，造成较大的经济损失。因此，探究采后黄瓜对贮藏低温响应的分子机理，能为改进采后贮运技术提供理论依据。

植物应答低温胁迫是一个十分复杂的调控过程<sup>[6]</sup>。关于植物应答低温胁迫的分子机理，在模式植物拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）上研究的比较清楚<sup>[7]</sup>。对拟南芥的研究显示，拟南芥主要通过依赖 CBF/DREB（C-repeat binding factor/dehydration responsive element binding protein）和不依赖 CBF/DREB 两种途径实现对低温信号的传导<sup>[8]</sup>。在 CBF 途径中，低温胁迫处理能在短时间内诱导 3 个 CBF 基因的表达，紧接着 CBF 蛋白被活化，直接作用于低温响应相关基因的启动子区域，激活或抑制下游靶基因的表达<sup>[9]</sup>。转录组分析发现，在拟南芥中大约只有 12% 的低温响应相关基因依

赖于 CBF 信号转导途径<sup>[10]</sup>。此外，转录后调控以及蛋白修饰也可能参与植物对低温信号的响应与传导<sup>[11-12]</sup>，显示植物对低温信号响应的复杂性。同时，拟南芥是非冷敏感型植物，且处于低温胁迫条件时仍没有脱离母体，冷敏感型采后果蔬对低温胁迫的应答机理可能很大区别于仍处于营养生长期的耐冷型植物，比如拟南芥。因此，探究冷敏感型采后果蔬响应低温胁迫的分子机理，对于完善和丰富植物低温胁迫应答机理具有重要意义。

随着高通量测序技术的快速发展，转录组测序已成为研究植物低温信号应答分子机理的重要方法之一<sup>[13-15]</sup>。本研究以采后黄瓜为试材，评估了采后黄瓜在低温贮藏期间的冷害情况，检测了 5℃ 低温贮藏的采后黄瓜在 72 h 以内的转录组变化，并结合生物信息学分析的方法，在转录组层面分析了采后黄瓜响应冷害温度的分子机理。分析采后黄瓜响应冷害低温处理的转录组变化，能鉴定出耐冷关键基因和关键防御途径，为耐冷相关基因的功能研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试黄瓜的商品名称为“翠夏”，父母本信息不详。从种植基地运到农贸市场前，未经预冷处理。将供试黄瓜在 2 h 内从农贸市场运回实验室，立即挑选果形基本一致、无病虫害和明显机械伤的果实，作为试验样品。将采后黄瓜分别放置在 3 个塑料筐中，每个筐中装 22 根，共 66 根。其中，30 根（3 个重复，每重复 10 根）用于观察在低温贮藏期间的冷害发生情况，另外 36 根用于取样分析，每次从中随机抽取 3 根。塑料筐装好黄

瓜后, 用塑料薄膜保鲜袋密封包装, 贮藏于 5℃ 的低温恒温培养箱中, 相对湿度为 95%~98%。共贮藏 12 d, 期间每间隔 2 d 观察一次冷害情况。转录组测序的样品在低温贮藏 12 h 和 72 h 时收集, 以果皮作为分析样品。果皮用削皮刀削下后, 立即用液氮速冻处理, 保存于-80℃ 冰箱。

## 1.2 方法

**1.2.1 采后黄瓜的冷害指数、相对电导率和 PS II 原初光能转化效率测定** 采后黄瓜的冷害症状表现为在果皮出现水渍状凹陷斑, 根据凹陷斑症状占果皮表面总面积的比例, 统计并计算采后黄瓜的冷害指数 (chilling injury index, CII) [16]。将冷害指数分为 5 级: 0 级, 未产生冷害症状; 1 级, 冷害症状的面积占单果表面积的比例低于 25%; 2 级, 冷害症状面积占单果表面积的比例为 26%~50%; 3 级, 冷害面积占单果表面积的比例为 51%~75%; 4 级, 冷害面积超过表面积的 75%。冷害指数 =  $\sum$  (级数 × 相应级数果实的数量) / 总果实数量。

采用电导率仪测定黄瓜果皮的相对电导率 (relative electrical conductivity, REC) [17]。用不锈钢削皮刀削取约 1 mm 厚度的黄瓜果皮, 用 0.5 cm 孔径的打孔器制得果皮小圆片, 每个重复 20 个小圆片。将小圆片放置在 50 mL 离心管中, 用超纯水冲洗 3 次, 沥干小圆片表皮水分。在离心管中加入 25 mL 的超纯水, 盖住离心管盖子。室温 (25℃) 浸泡 2 h, 测定果皮小圆片渗出物的初始电导值  $C_1$ 。然后将含有小圆片及渗出物的理性在沸水中煮 30 min, 自然冷却至室温 (25℃) 后, 测定渗出物的终止电导值  $C_2$ 。计算公式:  $REC (\%) = 100 \times (C_1/C_2)$ 。

在测定 PS II 原初光能转化效率 ( $F_v/F_m$ ) 前, 采后黄瓜在黑暗条件下处理 30 min, 将黄瓜果实横切成 3 等份, 取中间 1 段测定黄瓜果皮的 PS II 原初光能转化效率。具体测定方法见 WANG 等 [17] 的论文。

**1.2.2 黄瓜果皮总 RNA 提取和 cDNA 文库构建** 采用天根生化科技 (北京) 有限公司的 RNAPrep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (产品编号: DP441) 提取黄瓜果皮总 RNA, 操作方法和步骤严格按照试剂盒说明书进行。转录组测序在北京百迈客生物科技有限公司完成。使用 Agilent Bioanalyzer 2100 system 检测黄瓜果皮总 RNA 浓度和 RIN 值, 总 RNA 纯度使用超微量紫外分光

光度计 Nano Drop™ 仪器检测。质检合格的总 RNA 用 Illumina TruSeq™ RNA Sample Preparation Kit 试剂盒构建 cDNA 文库, 具体方法参照试剂盒说明书进行。构建好的文库用 ABI Step One Plus Real-Time PCR System 对文库的有效浓度 (>2 nmol/L 为有效浓度) 准确定量, 以保证 cDNA 文库质量。质检合格后, 用 Illumina 平台测序分析 [13]。

**1.2.3 基因组比对、差异表达基因筛选及富集分析** 测序完成后, 采用 HISAT (hierarchical indexing for spliced alignment of transcripts) 方法 [18], 以黄瓜基因组数据作为参考, 进行序列比对及后续分析, 黄瓜基因组数据库地址: <http://www.cucurbitgenomics.org/organism/20>。采用 DESeq2 法比较样品组间的基因表达差异 [19], 获得差异表达基因集。筛选差异表达基因的标准为: 差异倍数 (fold Change, FC) 大于等于 2.5, 且错误发现率 (false discovery rate, FDR) 小于 0.01 [13]。FC 由 2 组相比较样品的表达量得到, FDR 通过对差异显著性  $P$  值 ( $P$  value) 校正得到。

利用 NCBI 非冗余蛋白质数据库 (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/db/>)、GO (gene ontology, <http://www.geneontology.org/>)、大型蛋白质家族数据库 (<http://pfam.xfam.org/>)、蛋白质直系同源数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>)、KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes, <http://www.genome.jp/kegg>)、蛋白质序列注释数据库 Swiss-Prot (<http://www.uniprot.org/>) 等公共数据库注释基因功能。基于 GOseq R 软件中的 phyper 函数进行 GO 分类富集分析, 应用 R 软件进行 KEGG 通路富集分析 [20]。

**1.2.4 差异表达基因的表达分析** StringTie 通过最大流量算法, 采用 FPKM (fragments per kilobase of transcript per million fragments mapped) [21-22] 表示基因的表达水平。根据 KEGG 通路富集结果, 在北京百迈客生物科技有限公司的在线云平台 (<http://www.biocloud.net>) 上, 筛选与植物激素信号转导、植物-病原互作以及苯丙烷合成等途径中的差异表达基因。

随机挑选 9 个代表性差异表达基因, 采用荧光定量 PCR (qRT-PCR) 的方法验证其表达情况。使用上海翊圣生物科技有限公司的荧光定量 PCR 检测试剂盒 (产品编号: 11201ES03) 和美国

Bio-Rad 公司的荧光定量 PCR 仪分析 9 个代表性差异表达基因的表达情况。qRT-PCR 反应体系为：1  $\mu$ L 的 cDNA 模板，各 1  $\mu$ L 的正反向引物，10  $\mu$ L 的 PCR Mix 和 7  $\mu$ L 的 RNase free water，总反应

体积为 20  $\mu$ L。qRT-PCR 反应条件为：95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min，95 $^{\circ}$ C 变性 15 s、60 $^{\circ}$ C 退火 20 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 26 s，总共 40 个循环。引物信息见表 1，以黄瓜 *ACTIN* 基因 (CsaV3\_6G041900.1) 作为内参基因。

表 1 本研究所用引物  
Tab. 1 Primers used in this study

基因组中的登陆号 AGI No. in the genome	正向引物序列 (5'-3') Forward primer sequence (5'-3')	反向引物序列 (5'-3') Reverse primer sequence (5'-3')	产物长度 Product size/bp
CsaV3_3G012390	TGTCGGTCTATCCGCACTTG	TGCAGCAACAAAATGAAACCCA	136
CsaV3_4G004700	TGTGTTCAACATGCAAGCTCC	GGTTGGAGACAAAAGTTTGCCATT	138
CsaV3_6G044400	TACAGCTGGCGCTACATCAG	GGAGTTGGGAGGAGAAAAGGC	81
CsaV3_6G037780	ATATCCACCGTGTCCCAAGC	ACATCGATCCAGTCGCCATC	135
CsaV3_3G022370	AGGAACAATGGCGGTGTTGA	GGCGAACATCCCTCTTCCAA	90
CsaV3_3G036040	GGTGATCAGAGGTCGTTGCT	CCGTATTCCGCGTCTGATGA	71
CsaV3_3G022290	ACCTCATTGCTCCAGCGAAA	CTGCCAAAACTTCCCTCCA	111
CsaV3_3G034870	CAGCCAGACAGAATGCCAGA	AGCAAAGAGGCTACCACCAC	93
CsaV3_5G027300	AGCAGCAGGAGGAAGTTGAG	GAAACTTGGCTCCACGGACT	103
CsaV3_6G041900.1	CCCTGTGCTTCTGACTGAGG	TCCACTAGCGTAGAGGGACA	136

### 1.3 数据处理

使用 Excel 2016 软件记录、整理和分析数据。差异表达基因的火山图、GO 和 KEGG 富集分析在北京百迈客生物科技有限公司的在线云平台 (<http://www.biocloud.net/>) 完成，采用 Tertools 软件绘制差异表达基因的表达热图。

## 2 结果与分析

### 2.1 5 $^{\circ}$ C 低温贮藏期间采后黄瓜冷害情况

采后黄瓜对低温敏感，贮藏在 10 $^{\circ}$ C 低温及以

下温度时，即可发生冷害<sup>[17]</sup>。在 5 $^{\circ}$ C 低温贮藏期间，黄瓜冷害指数 (CII) 和相对电导率 (REC) 随贮藏时间逐渐增加，PS II 原初光能转化效率 ( $F_v/F_m$ ) 逐渐降低 (图 1)。0 d 时，采后黄瓜没有出现任何冷害症状，但在低温贮藏 12 d 时，CII 为 1.5。在贮藏 12 d 时，REC 比 0 d 高 58.20%， $F_v/F_m$  比 0 d 低 71.63%。说明采后黄瓜在 5 $^{\circ}$ C 低温贮藏期间发生了明显的冷害，且冷害症状随贮藏时间逐渐加重，在 12 d 时出现了严重的冷害症状。

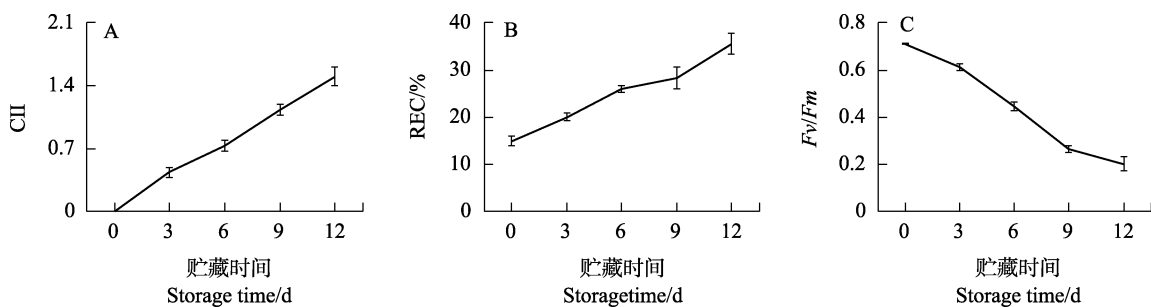


图 1 5 $^{\circ}$ C 低温贮藏期间采后黄瓜冷害情况

Fig. 1 Chilling injury of harvested cucumber during cold storage at 5 $^{\circ}$ C

### 2.2 转录组测序数据质量分析

测序包括对照组 (0 h) 和低温处理组 (12 h 和 72 h)，共 3 组样品。每组样品设置 3 个独立的生物学重复，共 9 个样品。测序数据经过组装、

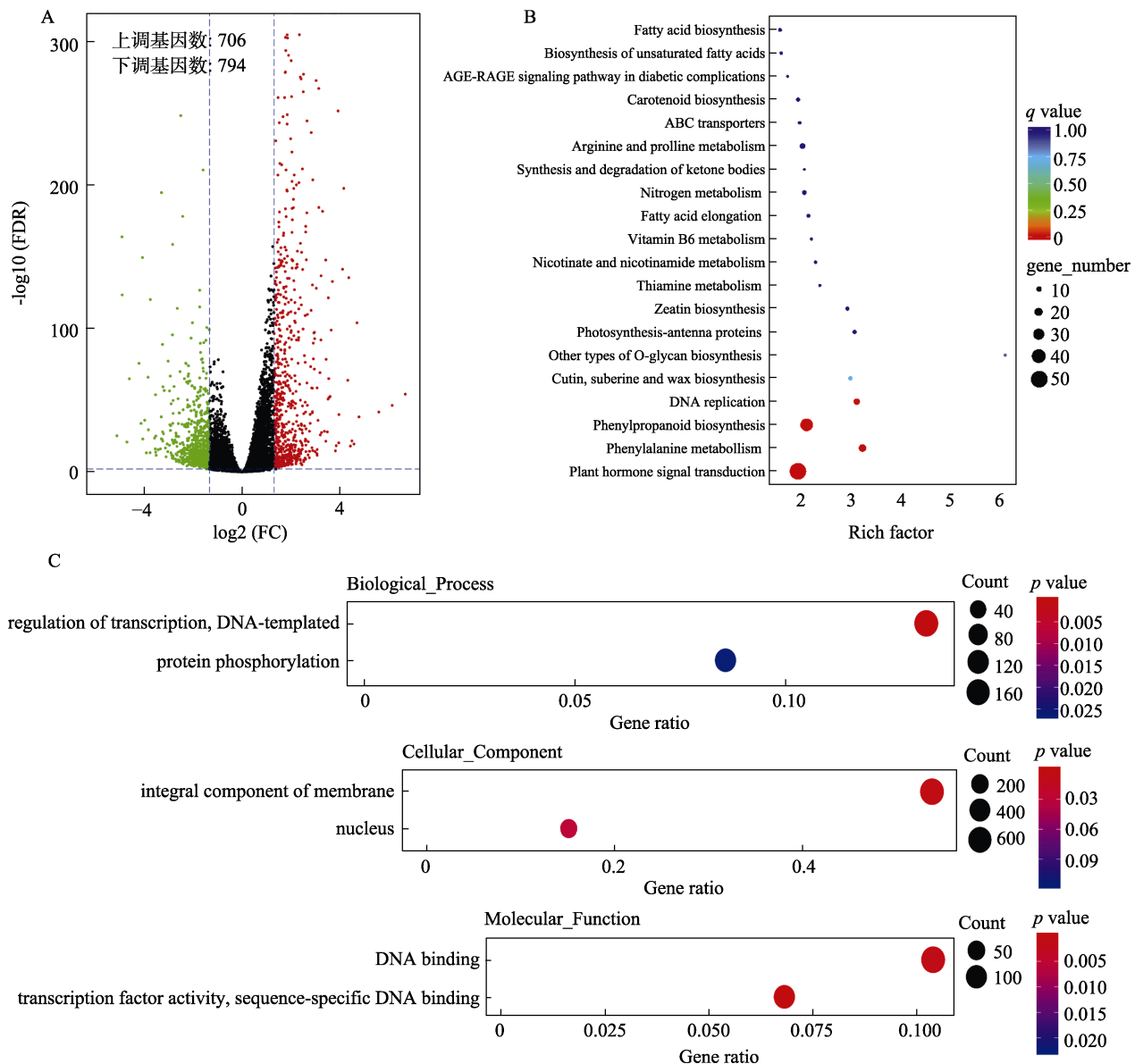
基因组比对后，基因组比对效率介于 85.37%~93.93% 之间，均值为 90.06%。9 个样品的平均 GC 含量比例为 44.32%，Q30 为 93.32%。这些结果表明，转录组测序数据的质量很高，可用于后续的

生物信息学分析。

### 2.3 低温处理 12 h 对黄瓜转录组的影响

通过火山图可以直观地查看基因在不同样品间表达水平的差异，以及统计学的差异显著性。与处理前 (0 h) 相比较，5°C 低温处理 12 h 导致 1500 个基因差异表达，其中 706 个基因表达上调，794 个基因表达下调 (图 2A)，表明采后黄瓜在转录组层面对胁迫低温作出了快速响应。分别采用 KEGG 通路富集和 GO 功能分类富集的分析方法，分析了受低温处理影响的差异表达基因的功能。

能。KEGG 通路富集分析的结果显示，植物激素信号转导 (plant hormone signal transduction) 通路富集的差异表达基因数量最多，且该通路的  $q$  值最低，其次是苯丙氨酸代谢 (phenylalanine metabolism) 和苯丙烷素生物合成 (phenylpropanoid biosynthesis) (图 2B)。GO 功能分类富集分析结果显示，在生物过程 (biological process) 分类下，差异表达基因被显著富集在以 DNA 为模板的转录调控 (regulation of transcription, DNA-templated) 和蛋白磷酸化 (protein phosphorylation) 2 个



A: 火山图，每个圆点代表一个基因。红色表示表达上调，绿色表示表达下调；B: KEGG 通路富集分析；C: GO 功能分类富集分析。  
A: Volcano plot, each dot represents one gene. Red indicates up-regulated expression and green indicates down-regulated expression;  
B: KEGG pathway enrichment analysis; C: GO functional classification analysis.

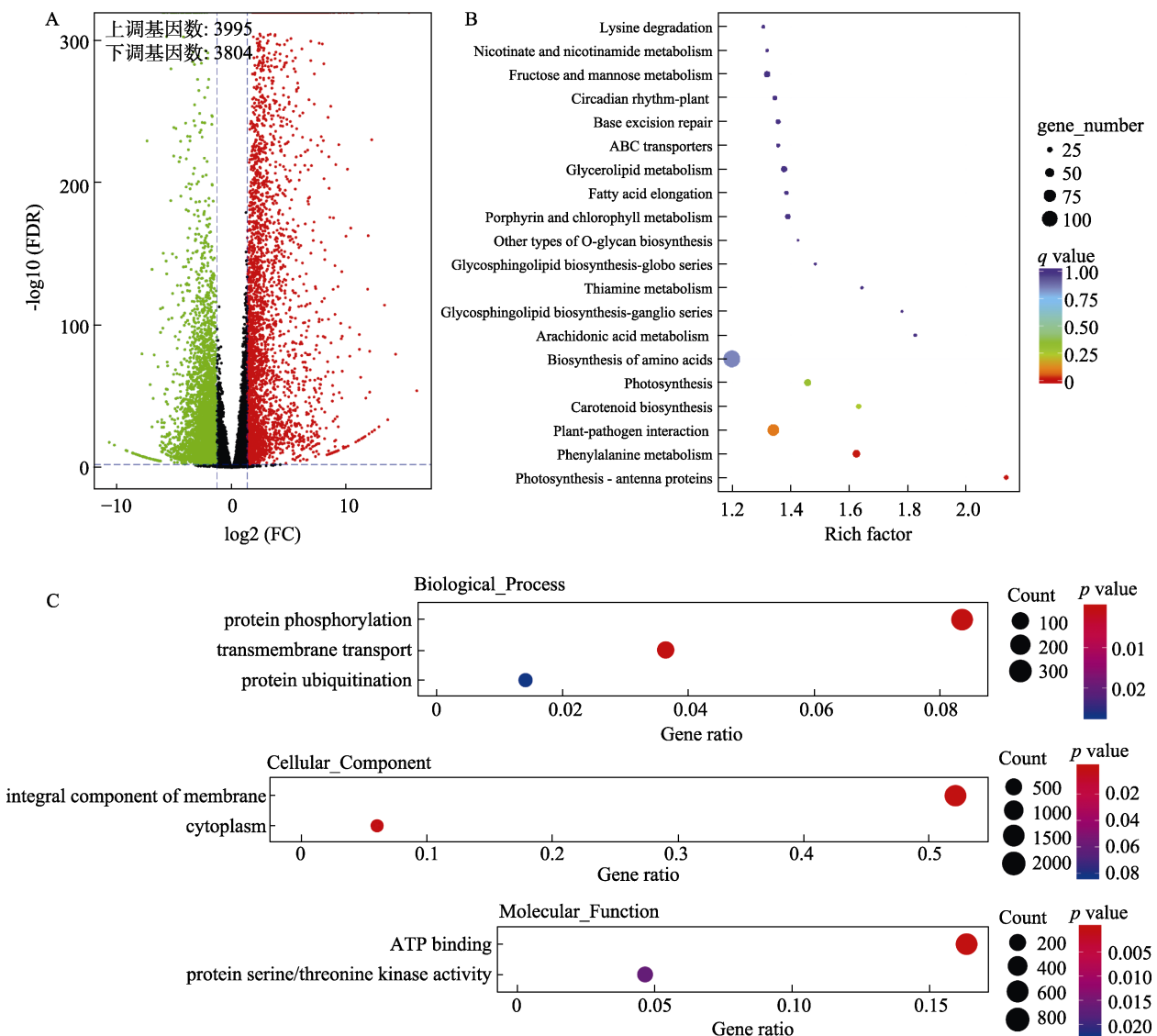
图 2 低温处理 12 h 的转录组变化

Fig. 2 Transcriptomic changes following 12 h of cold treatment

过程中；在细胞组份（cellular component）分类下中，被显著富集的差异表达基因主要与细胞膜（membrane）和细胞核（nucleus）有关；在分子功能（molecular function）中，差异表达基因的功能主要与 DNA 结合（DNA binding）和转录因子活性（transcription factor activity）功能有关（图 2C）。KEGG 和 GO 富集分析的结果表明，采后黄瓜响应低温胁迫可能是一个十分复杂的生理过程，涉及到植物激素信号转导、苯丙烷类化合物合成、蛋白磷酸化、转录调控、细胞器组分和形态变化等。

### 2.4 低温处理 72 h 对黄瓜转录组的影响

与低温处理 0 h 相比，5℃处理 72 h 导致 7799 个基因差异表达，其中 3995 个基因表达上调，3804 个基因表达下调（图 3A），表明较长时间的低温处理在转录组层面诱导了更广泛的反应。KEGG 通路富集分析的结果显示，苯丙氨酸代谢、植物病原菌互作（plant-pathogen interaction）和光合作用天线蛋白（photosynthesis-antenna proteins）3 个 KEGG 通路的富集可靠性最高（图 3B）。GO 功能分类富集分析结果显示，在生物过程分类下，差异表达基因被显著富集在跨膜转运（transme-



A: 火山图，每个圆点代表一个基因，红色表示表达上调，绿色表示表达下调；B: KEGG 通路富集分析；C: GO 功能分类富集分析。  
 A: Volcano plot, each dot represents one gene. Red indicates up-regulated expression and green indicates down-regulated expression;  
 B: KEGG pathway enrichment analysis; C: GO functional classification analysis.

图 3 低温处理 72 h 的转录组变化

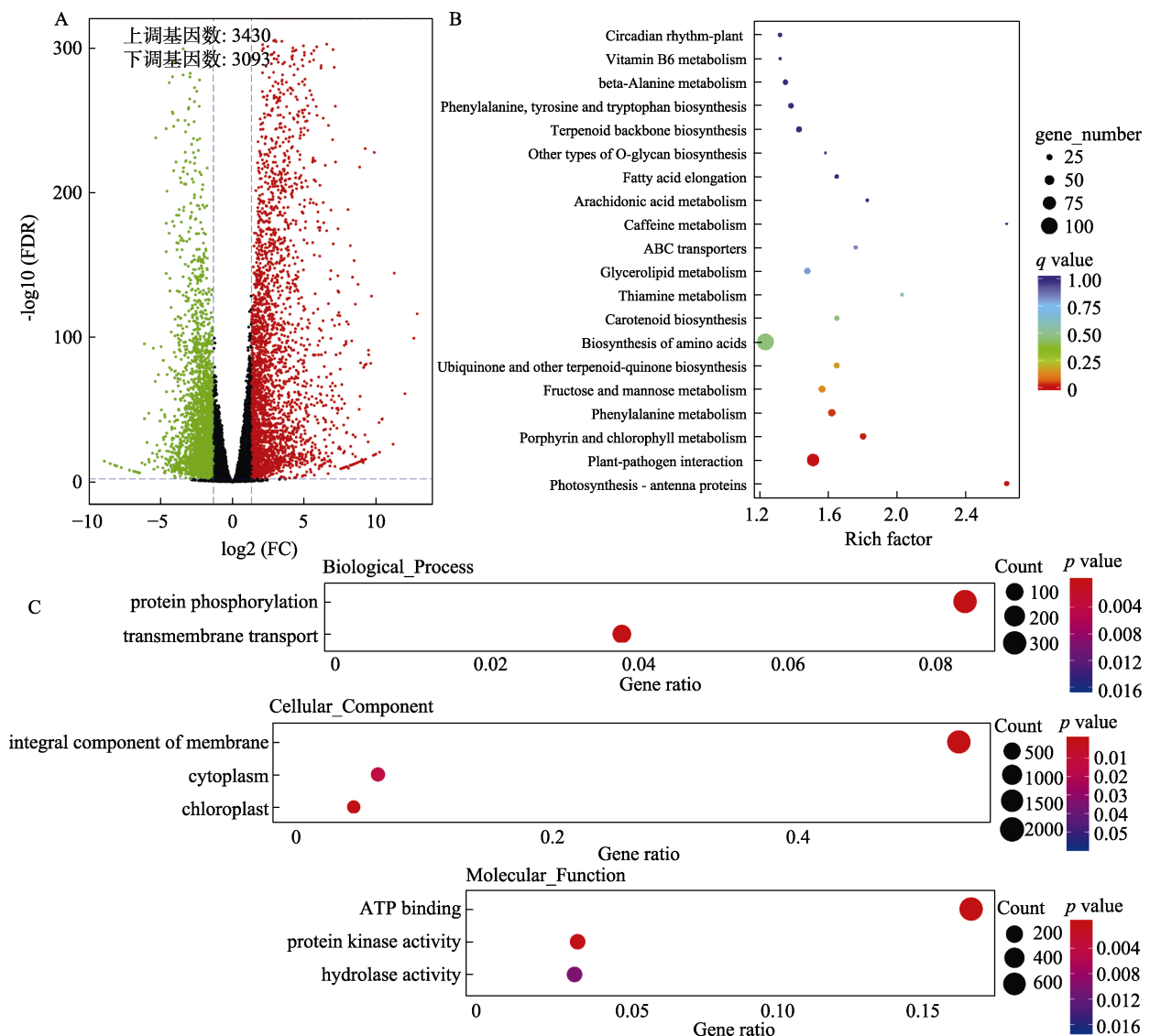
Fig. 3 Transcriptomic changes following 72 h of cold treatment

membrane transport)、蛋白泛素化 (protein ubiquitination) 和蛋白磷酸化 3 个过程中; 在细胞组分分类下, 被显著富集的差异表达基因主要与细胞膜和细胞质 (cytoplasm) 等细胞器有关; 在分子功能分类下, 差异表达基因的功能主要与 ATP 结合 (ATP binding) 和蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性 (protein serine/threonine kinase activity) 功能有关 (图 3C)。KEGG 和 GO 富集分析的结果表明, 蛋白磷酸化修饰和泛素化降解可能与采后黄瓜耐冷性密切相关。因为胁迫低温会使蛋白构象发生变化, 使蛋白丧失原有功能<sup>[5]</sup>。此外, 植物与病原菌互作有关的基因也被显著富集, 表明抗病相

关基因可能在采后黄瓜适应低温胁迫过程中扮演重要作用。

### 2.5 低温处理 72 h 与处理 12 h 间黄瓜转录组的差异

12 h 与 72 h 不同时长的低温处理组间共有 6523 个基因差异表达。与 12 h 处理相比, 3430 个基因在处理 72 h 时表达上调, 3093 个基因表达下调 (图 4A)。表明低温持续诱导了采后黄瓜在转录组层面的变化, 尽管采后黄瓜在低温处理 72 h 时已经表现出了一定程度的冷害症状。KEGG 通路富集分析的结果显示, 氨基酸合成 (biosynthesis of amino acids) 通路富集的差异表



A: 火山图, 每个圆点代表一个基因, 红色表示表达上调, 绿色表示表达下调; B: KEGG 通路富集分析; C: GO 功能分类富集分析。  
 A: Volcano plot, each dot represents one gene. Red indicates up-regulated expression and green indicates down-regulated expression;  
 B: KEGG pathway enrichment analysis; C: GO functional classification analysis.

图 4 低温处理 72 h 与 12 h 组间的转录组差异

Fig. 4 Transcriptomic differences between 72 h and 12 h of cold treatment

达基因数量最多, 但该通路的  $q$  值大于 0.50 (图 4B)。富集结果可靠性最高的 4 个 KEGG 通路分别是苯丙氨酸代谢、卟啉与叶绿素代谢 (porphyrin and chlorophyll metabolism)、植物病原菌互作和光合作用天线蛋白 (图 4B)。说明 72 h 的低温胁迫处理可能已经对采后黄瓜光合作用系统造成了损害, 再次表明冷害低温诱导的抗病相关基因表达可能与采后黄瓜耐冷性有关。GO 功能分类富集分析结果显示, 在生物过程分类下, 差异表达基因被显著富集在跨膜转运和蛋白磷酸化 2 个过程中; 在细胞组分分类下, 被显著富集的差异表达基因主要与细胞膜、细胞质和叶绿体 (chloroplast) 等细胞器有关; 在分子功能分类下, 差异表达基因的功能主要与 ATP 结合、蛋白激酶活性 (protein kinase activity) 和水解酶活性 (hydrolase activity) 功能有关 (图 4C)。与低温处理 12 h 相比, 采后黄瓜冷害在 5℃ 处理 72 h 时已经发生, 表明细胞膜、细胞质和叶绿体等细胞器的完整性受损, 胞内水解活性增加, 物质的跨膜运输加快。图 1B 的结果也反应, 采后黄瓜在 5℃ 贮藏 72 h (3 d) 细胞膜透性增大。

## 2.6 与植物激素信号有关的差异表达基因在低温处理期间的表达变化

由于低温处理 12 h 诱导的差异表达基因最显著富集到植物激素信号转导通路中, 暗示着低温胁迫处理通过影响植物激素含量传递信号。因此, 分析了与植物激素信号转导有关的差异表达基因在响应低温胁迫处理期间的表达模式。如图 5 所示, 低温处理影响 50 个与植物激素信号转导有关的基因差异表达, 这些差异表达基因的表达模式可大体分为 4 种类型 (图 5)。有些差异表达基因在胁迫低温处理后, 表达被 12 h 低温处理明显诱导, 但在处理 72 h 时, 其表达量又有所下降, 但仍比 0 h 高, 比如 CsaV3\_1G039360 基因; 有些差异表达基因的表达量持续被低温处理所诱导, 比如 CsaV3\_2G002930 基因的表达随处理时长而逐渐增强; 有些差异表达基因只被 12 h 的低温处理所诱导, 比如 CsaV3\_7G000720 基因; 另一些差异表达基因的表达显著被 12 h 和 72 h 的低温处理所抑制, 且随处理时长增加, 抑制效果越明显, 比如 CsaV3\_5G000620 基因。以上结果表明, 与植物激素信号有关的差异表达基因, 参与了采后黄瓜对低温胁迫信号的快速响应和传递。

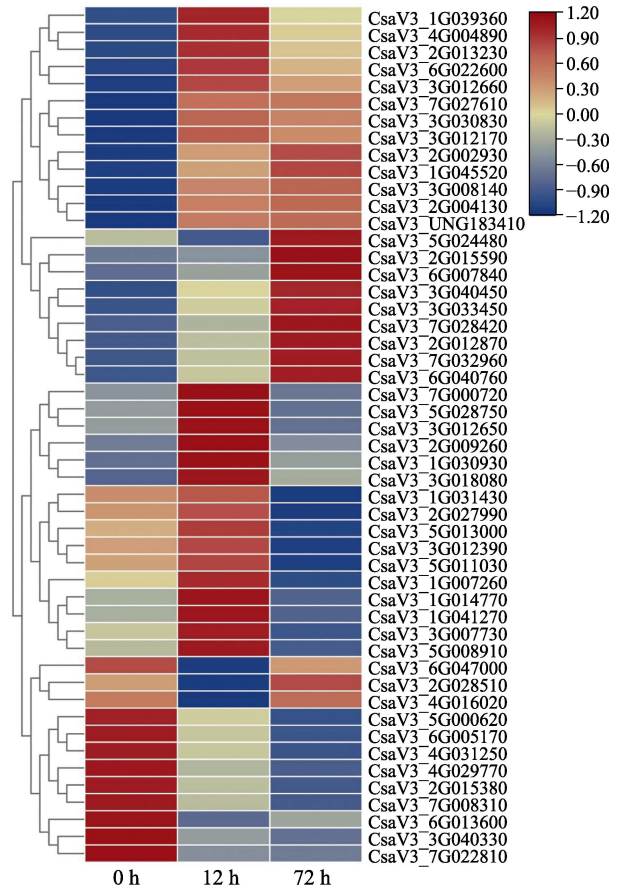


图 5 与植物激素信号有关的差异表达基因的表达模式  
Fig. 5 Expression pattern of DEGs related to plant hormone signal

## 2.7 与苯丙烷素合成有关的差异表达基因在低温处理期间的表达变化

在不同时长的低温处理中, 与苯丙烷素合成或者苯丙氨酸代谢途径有关的基因显著富集。为此, 重点分析了与苯丙烷素合成和苯丙氨酸代谢相关的差异表达基因在低温处理期间的表达模式。表达热图的结果显示, 在 5℃ 低温处理期间, 共鉴定到了 63 个苯丙烷途径的差异表达基因。其表达模式可大致分为 3 种, 一些差异表达基因被 2 个不同时长低温处理所诱导; 一些基因的表达被一种处理所诱导, 却被另一种处理所抑制; 一些差异表达基因的表达被低温处理抑制 (图 6)。其中, 31 个差异表达基因被至少 1 种时长的低温处理强烈诱导。比如, CsaV3\_3G030410 基因在 12 h 的表达量显著高于 0 h 和 72 h, 而 CsaV3\_6G039700 基因在 72 h 的表达量显著高于 0 h 和 12 h。6 个差异表达基因 (CsaV3\_7G031600、CsaV3\_7G008590、CsaV3\_6G039660、CsaV3\_5G033660、CsaV3\_3G032630 和 CsaV3\_1G013520)

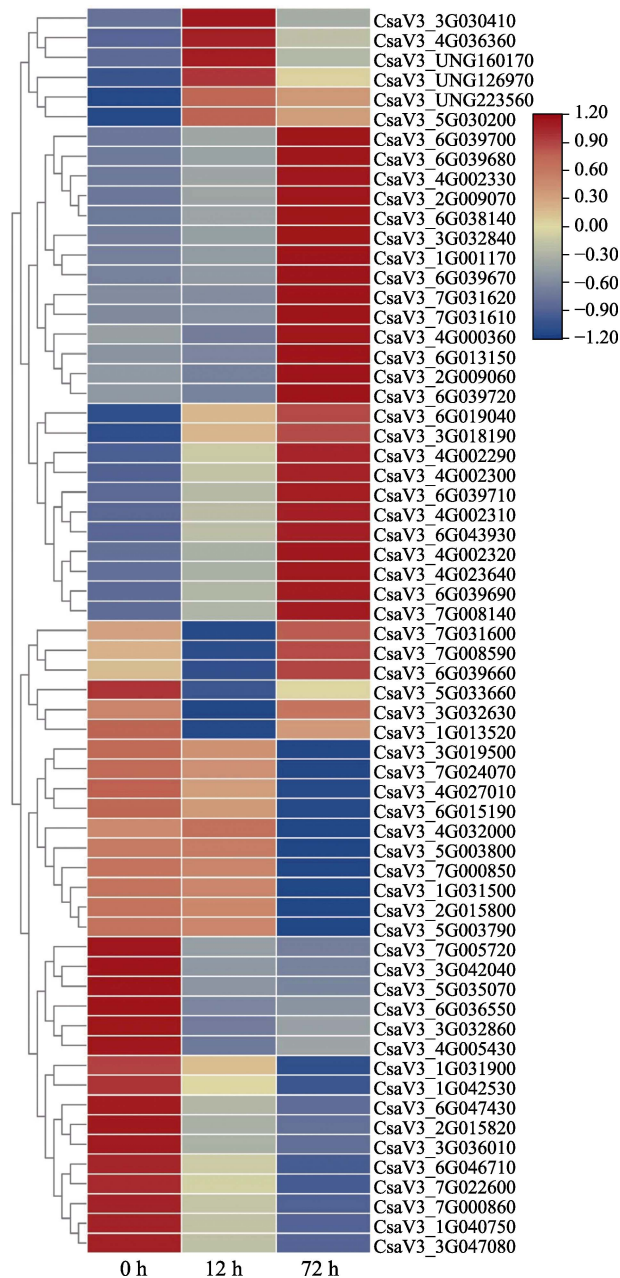


图 6 与苯丙烷素合成有关的差异表达基因的表达模式  
Fig. 6 Expression pattern of DEGs related to phenylpropanoid biosynthesis

在 12 h 时的表达量显著低于 0 h 和 72 h。26 个差异表达基因的表达被 2 种时长的低温处理所抑制，且处理时间越长，对表达的抑制效果越明显，比如 CsaV3\_3G019500 和 CsaV3\_3G047080 基因。表明低温处理影响苯丙氨酸代谢和苯丙烷素生物合成等过程，可能通过影响苯丙烷途径相关基因的表达，诱导苯丙烷素类物质的合成与积累。

## 2.8 与植物与病原菌互作有关的差异表达基因在低温处理期间的表达变化

72 h 的低温处理显著影响与植物-病原菌互

作有关基因的表达，表明植物-病原菌互作可能参与采后黄瓜对低温胁迫的适应过程。共鉴定到了 76 个与植物-病原菌互作有关的差异表达基因，其在低温处理期间的表达模式如图 7 所示。差异表达基因的表达模式大体可分为 2 种类型，低温处理诱导抑制 21 个差异表达基因的表达，却诱导 55 个差异表达基因的表达。比如，CsaV3\_1G045860 基因的表达量随低温处理时长而逐渐降低，但 CsaV3\_3G040820 基因的表达量随处理时长而逐渐增强。被低温处理显著影响的差异表达基因主要是与钙离子信号有关的基因，以及一些受体类的蛋白激酶、热激蛋白 (heat shock protein)、NADPH 氧化酶 (respiratory burst oxidase homolog, RBOH) 和 WRKY 转录因子基因。被低温处理所诱导的差异表达基因数量明显多于被抑制的，且 72 h 的低温处理对差异表达基因的诱导作用更强 (图 7)。表明低温处理诱导了更多抗病有关基因的表达，其表达可能是采后黄瓜应对低温胁迫的重要机制。

## 2.9 差异表达基因的 qRT-PCR 验证

为检验转录组数据的准确性和可靠性，从差异表达基因中，随机挑选了 9 个代表性基因，采用 qRT-PCR 法验证其表达<sup>[13]</sup>。在转录组测序的结果中，3 个差异表达基因 (CsaV3\_3G012390、CsaV3\_3G022370 和 CsaV3\_5G027300) 在低温处理 12 h 时表达量显著增加，在 72 h 时表达量又降低 (图 8A~图 8C)。5 个差异表达基因 (CsaV3\_3G022290、CsaV3\_6G037780、CsaV3\_3G034870、CsaV3\_3G036040 和 CsaV3\_4G004700) 的表达量随处理时长而显著增加 (图 8D~图 8H)。1 个差异表达基因 (CsaV3\_6G044400) 的表达在低温处理 12 h 时被抑制，却在处理 72 h 时再次被激活 (图 8I)。如图 8 所示，尽管同一差异表达基因在转录组和 qRT-PCR 分析结果中的差异倍数不完全一致，但其表达趋势是高度一致的。证明转录组数据的准确性与可信性很高，通过分析转录组数据得到的结论是可靠的。

## 3 讨论

采后黄瓜对低温敏感，在低温贮藏期间很容易发生冷害<sup>[23]</sup>。采后黄瓜的冷害症状主要表现为果皮出现水渍状凹陷斑，冷害严重程度与贮藏环境温度高低以及低温胁迫持续时间有关<sup>[17]</sup>。本研究中，采后黄瓜在 5℃ 温度下贮藏时产生了明显

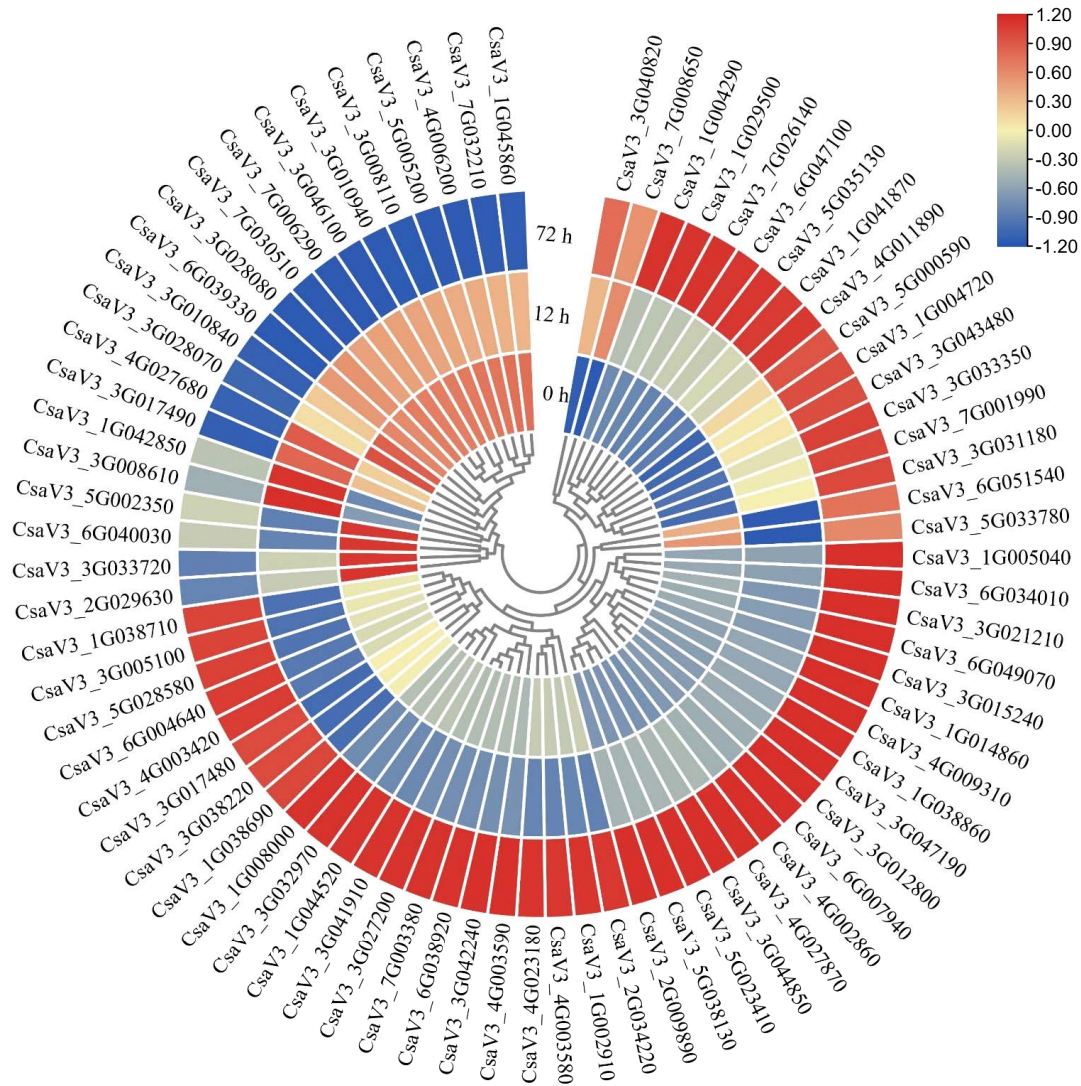
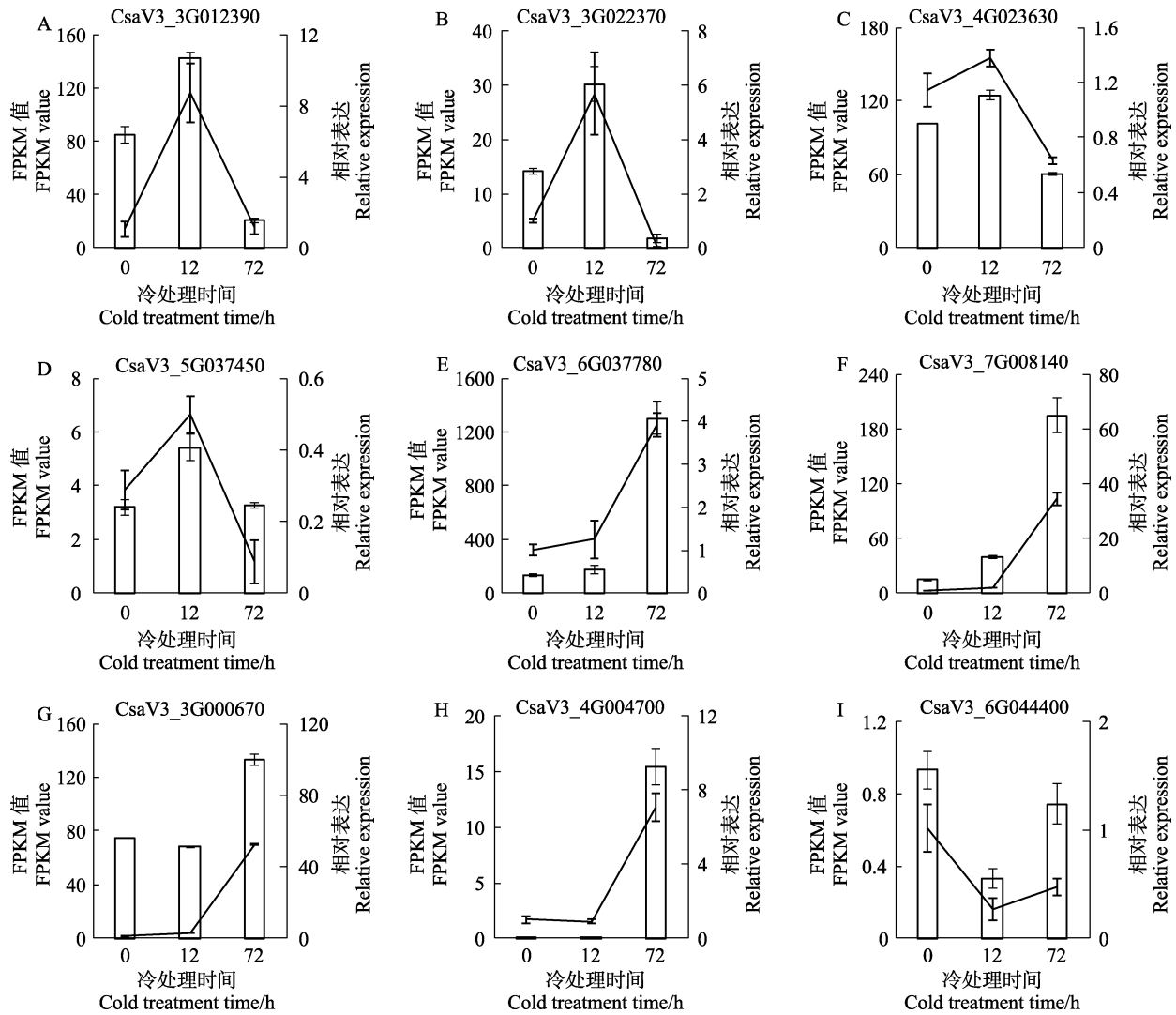


图 7 与植物与病原菌互作有关的差异表达基因的表达模式  
Fig. 7 Expression pattern of DEGs related to plant-pathogen interaction

的冷害症状, 表现为冷害指数和相对电导率增加, PS II 原初光能转化效率降低。冷害指数以及相对电导率与冷害严重程度正相关, 冷害指数和相对电导率越大, 采后黄瓜冷害越严重。 $F_v/F_m$  值与冷害程度负相关,  $F_v/F_m$  值越大, 光合作用系统完整性好, 冷害症状越轻<sup>[13]</sup>, 尽管采后黄瓜在贮藏期间光合作用较弱。表明可同时通过监测冷藏黄瓜的冷害指数、相对电导率和 PS II 原初光能转化效率的变化, 联合评估采后黄瓜的冷害情况。

植物激素作为重要的信号分子, 在传递胁迫信号过程中具有重要作用<sup>[24]</sup>。乙烯 (ethylene, ETH)、茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 与脱落酸 (abscisic acid, ABA) 与植物逆境胁迫密切相关, 许多研究的结果表明, 这 3 种植物激素均参与植

物对低温胁迫的响应<sup>[25]</sup>。本研究中, 鉴定到了 3 个与 ABA 信号有关的低温响应差异表达基因。其中, 低温处理诱导 2 个 ABA 受体基因 *PYL9* (CsaV3\_3G008140) 和 *PYL4* (CsaV3\_3G033450) 表达, 抑制了 *PYL8* (CsaV3\_5G000620) 表达 (图 5), 表明在采后黄瓜适应低温胁迫过程中 ABA 参与了对低温胁迫信号的传递。鉴定到了 4 个与 ETH 信号有关的差异表达基因, 低温诱导 2 个 *ETF1B* (ethylene-responsive transcription factor 1B) (CsaV3\_2G012870 和 CsaV3\_3G012170) 和 1 个 ETH 不敏感突变体 *EIN3* (ethylene-insensitive 3) (CsaV3\_2G002930) 表达, 2 个乙烯受体基因 *ER2* (ethylene receptor 2) (CsaV3\_3G012390) 和 *ER1* (CsaV3\_2G009260) 的表达只被 12 h 的低温处理所诱导, 且 72 h 的低温处理抑制 *ER2* 基因表



转录组结果用柱形图显示，qRT-PCR 结果用折线图显示。

The transcriptome results were displayed using column diagrams, qRT-PCR results were displayed using broken line diagrams.

图 8 qRT-PCR 验证差异表达基因

Fig. 8 Representative gene expression validated by qRT-PCR

达。EIN3 蛋白可通过与 F-box 蛋白 EBF1/2 (EIN3-binding F-box 1/2) 结合，激活 *CBF* 表达，并增强植物低温耐受性<sup>[26]</sup>。在番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 和烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 中，过表达乙烯响应因子 *ERF2* (ethylene responsive element binding factor 2) 能促进内源乙烯的合成<sup>[27]</sup>。表明乙烯信号参与了采后黄瓜对低温胁迫的响应，诱导的乙烯信号途径相关基因与低温应答密切相关。此外，4 个与 JA 信号有关的基因 (protein *TIFY*) (CsaV3\_3G030830、CsaV3\_1G041270、CsaV3\_1G007260 和 CsaV3\_6G007840)，在低温处理后表达量发生了显著变化。低温处理 12 h 均诱导这 4 个 *TIFY* 基因的表达，但在处理 72 h 时，*TIFY-10A* (CsaV3\_1G041270) 和 *TIFY-6B*

(CsaV3\_1G007260) 的表达量显著低于 0 h 时的表达量。在植物中，*TIFY* 蛋白是 JA 信号的抑制子，负调控 JA 反应<sup>[28]</sup>。低温处理能诱导 JA 合成，外源 JA 处理也能增强植物的抗冷性<sup>[29]</sup>。表明短时的低温处理通过激活 *TIFY* 基因表达，抑制了 JA 信号反应，激活 JA 信号反应可能需要更长时间的低温处理。

油菜素内酯 (brassinolide, BR)、赤霉素 (gibberellin, GA)、吲哚乙酸 (indole-3-acetic acid, IAA) 和生长素 (auxin, AUX) 是植物生长类激素，现有的研究证实，这 4 种激素也参与植物对低温的响应与调控<sup>[30]</sup>。本研究中，共鉴定了 17 个与 AUX 信号有关的差异表达基因，其中 6 个是 *AUI* (auxin-induced protein) 基因，11 个是 *AUR*

(auxin-responsive protein)。4 个 *AUR* 基因 (CsaV3\_1G030930、CsaV3\_6G040760、CsaV3\_2G015590 和 CsaV3\_1G045520) 的表达均被不同时长低温处理所诱导, 却抑制 4 个 *AUR* 基因 (CsaV3\_7G022810、CsaV3\_6G047000、CsaV3\_6G013600 和 CsaV3\_2G015380) 表达, 3 个 *AUR* 基因 (CsaV3\_7G000720、CsaV3\_3G012650 和 CsaV3\_3G007730) 的表达在 12 h 时被诱导, 却在 72 h 时被抑制, 表明 AUX 十分复杂地参与低温信号的传导。低温处理诱导 2 个 GA 受体基因 *GR-1C* (gibberellin receptor 1C) 和 *GR-1B* (CsaV3\_1G039360 和 CsaV3\_7G028420) 的表达, 表明低温处理激活了 GA 信号途径。与 0 h 相比, *BKII* (brassinolide kinase inhibitor 1) (CsaV3\_2G027990) 在 12 h 时表达上调, 72 h 却抑制其表达, *BZR1* (brassinazole-resistant 1) 的表达模式刚好与 *BKII* 基因相反。在植物中, *BKII* 负调控 BR 信号<sup>[31]</sup>, *BZR1* 正向调控 BR 信号<sup>[32]</sup>。表明 BR 信号传导反应被短期低温处理所抑制, BR 信号可能是其他信号的下游事件, 比如 ETH 和 ABA 信号。此外, 低温处理还诱导一个 IAA 合成酶基因 (CsaV3\_3G018080) 的表达, 表明低温处理促进了 IAA 的生物合成, 诱导的 IAA 可能参与低温信号的传导过程。

植物体内含有种类和含量丰富的次生代谢产物, 其具有抗细胞毒性、抑菌、抗氧化等多种生物活性<sup>[33-34]</sup>。研究表明, 酚类物质在采后果蔬抵御低温胁迫过程中发挥重要作用, 而苯丙烷途径是合成酚类物质的主要通路<sup>[35]</sup>。本研究中, 低温处理诱导的差异表达基因被显著富集在苯丙氨酸代谢和苯丙烷素合成途径中。苯丙氨酸是合成大部分酚类物质的初始化合物<sup>[36]</sup>。本研究中, KEGG 富集分析共鉴定到了 43 个与苯丙氨酸代谢有关的差异表达基因, 其中 27 个被低温显著诱导, 16 个在低温处理后表达量下降。表明低温处理促进了苯丙氨酸代谢活性, 为酚类化合物合成提供了充足前体物质。49 个差异表达基因与苯丙烷素合成有关, 其中, 低温诱导 34 个相关基因的表达, 却抑制 15 个相关基因的表达。被低温诱导的差异表达基因数量明显多于被抑制的, 表明低温处理激活了苯丙烷生物合成途径。诱导苯丙烷类物质的生物合成和积累, 可能是采后黄瓜应对低温胁迫的重要机制。

植物与病原菌互作相关基因表达与植物耐冷

性密切相关<sup>[37]</sup>。低温处理显著诱导钙信号相关基因表达, 且钙信号与一氧化氮 (nitric oxide, NO)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 信号协作, 共同调控植物耐冷性<sup>[38]</sup>。本研究中, 76 个与植物-病原菌互作有关的基因在低温处理后差异表达。其中, 38 个差异表达基因是钙信号相关基因, 4 个是 *RBOH* 基因 (CsaV3\_1G038860、CsaV3\_5G002350、CsaV3\_1G002910 和 CsaV3\_3G043480), 1 个是 NO 信号相关基因 (CsaV3\_5G005200), 4 个是 WRKY 转录因子基因 (CsaV3\_3G008610、CsaV3\_1G004720、CsaV3\_3G033350 和 CsaV3\_1G044520), 4 个是热激蛋白基因 (heat shock protein, HSP) (CsaV3\_3G017490、CsaV3\_1G038710、CsaV3\_1G038690、CsaV3\_3G017480), 4 个是病程相关基因 (CsaV3\_1G045860、CsaV3\_7G026140、CsaV3\_2G009890 和 CsaV3\_3G010840)。低温处理诱导绝大多数的与病原菌互作有关的差异表达基因, 且诱导强度随处理时间而加强; 仅个别基因表达被低温处理抑制, 比如低温处理只抑制 6 个钙信号相关基因的表达。表明低温处理诱导了与病原互作有关基因的表达, 诱导抗病相关基因表达可能有助于采后黄瓜适应低温胁迫。

此外, GO 功能分类富集的结果显示, 低温诱导的差异表达基因的功能还与蛋白磷酸化和泛素化、跨膜转运、亚细胞器组分、DNA 和 ATP 结合活性等有关, 表明采后黄瓜响应并对低温胁迫作出抗性, 是一个复杂的反应过程, 涉及蛋白磷酸化修饰和泛素化降解、细胞器形态和组分改变、转录调控、能量代谢平衡等多种分子和生理活动。

综上所述, 胁迫低温导致冷害指数和相对电导率增加, PS II 原初光能转化效率降低, 表明可通过监测这 3 个指标变化判断采后黄瓜冷害情况。与 JA、ETH、ABA 等植物激素信号感受有关的差异表达基因被短时的低温处理诱导, 表明植物激素信号参与低温信号响应与转导。低温处理诱导了许多苯丙烷合成基因的表达, 表明诱导苯丙烷类物质的合成积累, 可能是采后黄瓜适应低温胁迫的重要防御机制。低温处理诱导了大量与病原菌互作有关基因的表达, 表明低温诱导的抗病相关基因表达与采后黄瓜耐冷性有关。研究结果为采后黄瓜响应低温胁迫的分子机理提供了新见解。

## 参考文献

- [1] 高红豆, 胡文忠, 管玉格, 姬亚茹, 冯可, 张艳慧, 于皎雪. 采后果蔬呼吸代谢途径及其调控研究进展[J]. 包装工程, 2021, 42(15): 30-38.  
GAO H D, HU W Z, GUAN Y G, JI Y R, FENG K, ZHANG Y H, YU J X. Research achievements in respiration metabolism way and control methods of post-harvest fruits and vegetables[J]. Packaging Engineering, 2021, 42(15): 30-38. (in Chinese)
- [2] 蒋跃明, 段学武. 我国果蔬采后生理学进展[J]. 热带亚热带植物学报, 2019, 27(5): 558-564.  
JIANG Y M, DUAN X W. Advances in postharvest physiology of fruits and vegetables in China[J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2019, 27(5): 558-564. (in Chinese)
- [3] 王斌, 武春爽, 何金明, 王光, 曲姗姗, 朱世江. *CsCAT3* 克隆与其在冷驯化诱导采后黄瓜耐冷性中的作用初探[J]. 核农学报, 2021, 35(10): 2267-2276.  
WANG B, WU C S, HE J M, WANG G, QU S S, ZHU S J. Cloning of *CsCAT3* and its role in pre-storage cold acclimation-induced chilling tolerance in harvested cucumber[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2021, 35(10): 2267-2276. (in Chinese)
- [4] 张丹丹, 屈红霞, 段学武, 蒋跃明. 热带果蔬采后冷害研究进展[J]. 热带作物学报, 2020, 41(10): 2062-2079.  
ZHANG D D, QU H X, DUAN X W, JIANG Y M. Advances in postharvest chilling injury of tropical fruit and vegetable[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2020, 41(10): 2062-2079. (in Chinese)
- [5] WANG B, SHEN F, ZHU S J. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in cucumber (*Cucumis sativus*) fruit peel in response to pre-storage cold acclimation[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 8: 2167.
- [6] THOMASHOW M F. Molecular basis of plant cold acclimation: Insights gained from studying the CBF cold response pathway[J]. Plant Physiology, 2010, 154: 571-577.
- [7] ECKARDT N A. DREB duo defines distinct drought and cold response pathways[J]. Plant Cell, 2019, 31(6): 1196-1197.
- [8] RIHAIL H Z, AL-ISSAWI M, FULLER M P. Advances in physiological and molecular aspects of plant cold tolerance[J]. Journal of Plant Interactions, 2017, 12(1): 143-157.
- [9] AKHTAR M, JAISWAL A, TAJ G, JAISWAL J P, QURESHI M I, SINGH N K. DREB1/CBF transcription factors: Their structure, function and role in abiotic stress tolerance in plants[J]. Journal of Genetics, 2012, 91(3): 385-395.
- [10] FOWLER S, THOMASHOW M F. Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway[J]. Plant Cell, 2002, 14(8): 1675-1690.
- [11] 丁杨林. 蛋白激酶 OST1 调控拟南芥响应低温胁迫的分子机制[D]. 北京: 中国农业大学, 2015.  
DING Y L. Mechanisms of cold stress responses regulated by the protein kinase OST1 in *Arabidopsis*[D]. Beijing: China Agricultural University, 2015. (in Chinese)
- [12] WANG B, WANG G, ZHU S J. DNA damage inducible protein 1 is involved in cold adaption of harvested cucumber fruit[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 10: 1723.
- [13] WANG B, WU C S, WANG G, HE J M, ZHU S J. Transcriptomic analysis reveals a role of phenylpropanoid pathway in the enhancement of chilling tolerance by pre-storage cold acclimation in cucumber fruit[J]. Scientia Horticulturae, 2021, 288: 110282.
- [14] LI Y Y, WANG X W, BAN Q Y, ZHU X X, JIANG C J, WEI C L, BENNETZEN J L. Comparative transcriptomic analysis reveals gene expression associated with cold adaptation in the tea plant *Camellia sinensis*[J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 624.
- [15] WU Z J, HAN S M, ZHOU H D, TUANG Z K, WANG Y Z, JIN Y, SHI H Z, YANG W N. Cold stress activates disease resistance in *Arabidopsis thaliana* through a salicylic acid dependent pathway[J]. Plant, Cell and Environment, 2019, 42(9): 2645-2663.
- [16] 王斌, 朱世江. 阶段降温对冷藏黄瓜耐冷性的诱导作用[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(4): 1028-1035.  
WANG B, ZHU S J. Induction of chilling tolerance in cold-stored cucumbers by slowly cooling treatment[J]. Jiangsu Journal of Agriculture Science, 2020, 36(4): 1028-1035. (in Chinese)
- [17] WANG B, ZHU S J. Pre-storage cold acclimation maintained quality of cold-stored cucumber through differentially and orderly activating ROS scavengers[J]. Postharvest Biology and Technology, 2017, 129: 1-8.
- [18] KIM D, LANGMEAD B, SALZBERG S L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements[J]. Nature Methods, 2015, 12(4): 357-360.
- [19] LOVE M I, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. Genome Biology, 2014, 15(12): 550.
- [20] 蒋彧, 何俊蓉. 国兰叶色突变体根状茎差异表达基因分析[J]. 核农学报, 2022, 36(3): 497-508.  
JIANG Y, HE J R. Analysis of differential expression genes in rhizome of leaf color mutant of Chinese orchid[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2022, 36(3): 497-508. (in Chinese)

- Chinese)
- [21] WANG J M, WANG Q, YANG Y, LIU X H, GU J H, LI W, MA S Y, LU Y M. *De novo* assembly and characterization of stress transcriptome and regulatory networks under temperature, salt and hormone stresses in *Lilium lancifolium*[J]. *Molecular Biology Reports*, 2014, 41(12): 8231-8245.
- [22] 陈艺荃, 方能炎, 叶秀仙, 罗远华, 钟淮钦, 黄敏玲, 樊荣辉. 基于转录组测序的文心兰花香形成分析[J]. *核农学报*, 2022, 36(3): 578-588.
- CHEN Y Q, FANG N Y, YE X X, LUO Y H, ZHONG H Q, HUANG M L, FAN R H. Analysis of floral scent formation in *Oncidium* orchid based on transcriptome sequencing[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2022, 36(3): 578-588. (in Chinese)
- [23] 贾雯茹, 赵紫迎, 左小霞, 金鹏, 金文渊, 郑永华. 高湿贮藏减轻黄瓜果实冷害的效果研究[J]. *南京农业大学学报*, 2020, 43(3): 529-536.
- JIA W R, ZHAO Z Y, ZUO X X, JIN P, JIN W Y, ZHENG Y H. Effects of high relative humidity storage on alleviating chilling injury of cucumber fruit[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2020, 43(3): 529-536. (in Chinese)
- [24] EREMINA M, ROZHON W, POPPENBERGER B. Hormonal control of cold stress responses in plants[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2015, 73(4): 1-14.
- [25] KU Y S, SINTAHA M, CHEUNG M Y, LAM H M. Plant hormone signaling crosstalks between biotic and abiotic stress responses[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(10): 3206.
- [26] SHI Y T, TIAN S W, HOU L Y, HUANG X Z, ZHANG X Y, GUO H W, YANG S H. Ethylene signaling negatively regulates freezing tolerance by repressing expression of *CBF* and type-A *ARR* genes in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2012, 24(6): 2578-2595.
- [27] ZHANG Z J, HUANG R F. Enhanced tolerance to freezing in tobacco and tomato overexpressing transcription factor *TERF2/LeERF2* is modulated by ethylene biosynthesis[J]. *Plant Molecular Biology*, 2010, 73(3): 241-249.
- [28] HAN X, ZHANG M H, YANG M L, HU Y R. *Arabidopsis* JAZ proteins interact with and suppress *RHD6* transcription factor to regulate jasmonate-stimulated root hair development[J]. *Plant Cell*, 2020, 32(4): 1049-1062.
- [29] HU Y R, JIANG Y J, HAN X, WANG H P, PAN J J, YU D Q. Jasmonate regulates leaf senescence and tolerance to cold stress: Crosstalk with other phytohormones[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(6): 1361-1369.
- [30] LI A X, ZHOU M Q, WEI D H, CHEN H, YOU C J, LIN J. Transcriptome profiling reveals the negative regulation of multiple plant hormone signaling pathways elicited by over-expression of C-repeat binding factors[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1647.
- [31] WANG X, CHORY J. Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane[J]. *Science*, 2006, 313(5790): 1118-1122.
- [32] VILARRASA-BLASI J, GONZALEZ-GARCIA M P, FRIGOLA D, FABREGAS N, ALEXIOU K G, LOPEZ-BIGAS N, RIVAS S, JAUNEAU A, LOHMANN J U, BENFEY P N, IBANES M, CANO-DELGADO A I. Regulation of plant stem cell quiescence by a brassinosteroid signaling module[J]. *Development Cell*, 2014, 30(1): 36-47.
- [33] NACZK M, SHAHIDI F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, 41(5): 1523-1542.
- [34] XIAO Y H, ZHANG J L, JIANG Y Y, YUAN Y, XIE J, HE J, WANG B. Cinnamic acid treatment reduces the surface browning of fresh-cut taro[J]. *Scientia Horticulturae*, 2022, 291: 110613.
- [35] 高媛, 马帅, 代敏, 王蒙, 冯晓元. 果蔬酚酸生物合成及代谢调控研究进展[J]. *食品科学*, 2018, 39(9): 286-293.
- GAO Y, MA S, DAI M, WANG M, FENG X Y. Progress in research on the biosynthesis pathway and metabolic regulation of phenolic acids[J]. *Food Science*, 2018, 39(9): 286-293. (in Chinese)
- [36] ADAMS Z P, EHLTING J, EDWARDS R. The regulatory role of shikimate in plant phenylalanine metabolism[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2019, 462: 158-170.
- [37] ZHUANG D F, MA C, XUE L, LI Z, WANG C, LEI J J, YUAN X F. Transcriptome and *de novo* analysis of *Rosa xanthina* f. *spontanea* in response to cold stress[J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 472.
- [38] YUAN P G, YANG T B, POOVAIAH B W. Calcium signaling-mediated plant response to cold stress[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(12): 3896.