

网络出版时间:2014-11-04 14:44

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.12.018

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.12.018.html

ALA 对苹果幼果黄酮含量及 *CHS* 和 *CHI* 基因表达的影响

陈 磊, 郭玉蓉, 张晓瑞, 米瑞芳

(陕西师范大学 食品工程与营养科学学院, 陕西 西安 710019)

[摘 要] **【目的】**分析 5-氨基乙酰丙酸(ALA)处理对苹果幼果黄酮含量及查尔酮合成酶基因(*CHS*)、查尔酮异构酶基因(*CHI*)表达量的影响,以确定适宜的 ALA 处理质量浓度和处理时间。**【方法】**在苹果疏果期前,用 0(对照), 100, 200, 300 和 400 mg/L ALA 处理苹果幼果,采用紫外分光光度法测定 ALA 处理后 3, 6, 9, 12 d 幼果中的黄酮含量,同时利用荧光定量法测定幼果中 *CHS* 和 *CHI* 基因的相对表达量。**【结果】**在 ALA 质量浓度为 0~300 mg/L 时,随着 ALA 质量浓度的升高,苹果黄酮含量与 *CHS*、*CHI* 基因表达量均相应升高;在 ALA 质量浓度升至 400 mg/L 时,各项指标均表现出下降趋势。用不同质量浓度 ALA 处理苹果幼果后,幼果的黄酮含量和 *CHS*、*CHI* 基因表达量均较对照明显提高,其中黄酮含量在处理 12 d 达到最高,而 *CHS* 和 *CHI* 基因相对表达量在处理 9 d 时达到最高,12 d 后开始下降。**【结论】**为提高苹果疏除果中的黄酮含量,宜选择 300 mg/L 的 ALA 在疏果前 6~9 d 对苹果幼果进行喷洒。

[关键词] 苹果幼果;黄酮;*CHS*;*CHI*;基因表达

[中图分类号] S661.109.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2014)12-0161-05

Effect of 5-Aminolevulinic acid on flavonoids content and expression of *CHS* and *CHI* genes of young apples

CHEN Lei, GUO Yu-rong, ZHANG Xiao-rui, MI Rui-fang

(College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710019, China)

Abstract: **【Objective】** The study aimed to explore the effect of 5-aminolevulinic acid (ALA) on flavonoids content and relative expression of chalcone synthase (*CHS*) and chalcone isomerase (*CHI*) of young apples to determine suitable ALA mass concentration and processing time. **【Method】** Before thinning young apples, ALA solutions with concentrations of 0 (CK), 100, 200, 300 and 400 mg/L ALA were used to treat young apples and contents of young apple flavonoids were determined by UV. At the same time, the relative expression of *CHS* and *CHI* was determined by qPCR. **【Result】** When the ALA mass concentration was 0—300 mg/L, the content of flavonoids and the relative expression of *CHS* and *CHI* increased as the increase of ALA mass concentration. When the mass concentration of ALA increased to 400 mg/L, all indexes started to decrease. The content of flavonoids and the relative expression of *CHS* and *CHI* were significantly improved by ALA solutions with different mass concentrations. Among them, the content of flavonoids achieved the highest values at 12 d, and the maximum relative expression of *CHS* and *CHI* values were achieved at 9 d and began to fall after 12 d. **【Conclusion】** To improve the content of

[收稿日期] 2013-09-22

[基金项目] 现代农业产业技术体系建设专项(GK661001)

[作者简介] 陈 磊(1988—),男,河南光山人,硕士,主要从事食品生物技术与食品储藏研究。E-mail:chen122148@163.com

[通信作者] 郭玉蓉(1962—),女,甘肃兰州人,教授,博士,博士生导师,主要从事食品生物加工研究。

E-mail:guoyurong730@163.com

flavonoids in thinned young apples,300 mg/L ALA was suitable to be sprayed 6—9 d before thinning.

Key words: young apple; flavonoids; *CHS*; *CHI*; gene expression

黄酮类化合物是一类多酚类次生代谢物质,具有抗动脉硬化、降低胆固醇、解痉、防辐射、抗病原微生物等多种功效,因而越来越引起人们的重视^[1-2]。苹果是提取黄酮的主要原材料之一,而苹果幼果中的黄酮含量是成熟果的 10 倍^[3]。苹果疏果工作是解决坐果过量、克服大小年、提高果品品质、实现持续均衡丰产的必要技术措施。在中国,每年约有 160 万 t 的苹果疏果腐烂在果园里,造成了资源的极度浪费^[4]。因此,从苹果幼果中提取黄酮对于充分利用苹果疏果资源具有重要意义。

5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid, ALA)不仅是生物体内合成卟啉化合物的第一个关键前体^[5],而且还参与了植物生长发育的调节过程。低质量浓度的 ALA(<500 mg/L)能通过刺激苯丙烷代谢系统而提高植物多酚含量^[6-7],也可以增强植物的抗逆性^[8]。查尔酮合成酶(Chalcone sythase, CHS)是类黄酮次生代谢途径中的第一个关键酶^[9],能催化香豆酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 合成查尔酮^[10],查尔酮分子的异构化和功能基团的进一步取代都能导致黄酮、异黄酮和花色素苷的合成^[11]。查尔酮异构酶(Chalcone isomerase, CHI)是类黄酮代谢途径中继查尔酮合成酶(CHS)后的第 2 个关键酶,其能催化黄色的苯基苯乙烯酮(Benzylidenacetophenone)转变成无色的黄烷酮(Flavanone),进而衍生出该途径中所有的类黄酮化合物^[12]。本试验用 ALA 处理苹果疏果期前的幼果,研究苹果幼果中黄酮含量的变化,从影响苹果 *CHS* 和 *CHI* 基因表达层面探究苹果幼果黄酮的变化规律,为苹果幼果中黄酮的利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

试验选择陕西省咸阳市礼泉县苹果综合试验站的 10 年生“长富 2 号”苹果树,在苹果疏果期前 20 d (2013-04-15),挑选 5 株 10 年生且树势接近的果树作为试验树。分别用质量浓度为 0(CK),100,200,300 和 400 mg/L 的 ALA 喷洒幼果,喷洒处理后 3,6,9 和 12 d 采摘幼果,经液氮速冻后置-80 ℃保存备用。每株试验树每次取幼果 20 个。

1.2 试验设备与试剂

StepOne RT-PCR 仪由美国 ABI 公司生产,

UNICO PC2102 型紫外/可见光分光光度计由北京吉天仪器有限公司制造,TGL-16G 高速低温离心机由上海安亭生产。M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒由上海生工生物技术有限公司提供,荧光定量试剂盒 Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) 由 Thermo 公司提供,其他试剂均为国产分析纯或化学纯,PCR 引物由上海生工生物技术有限公司合成。

1.3 苹果幼果总黄酮含量的测定

参照克热木江·吐尔逊江等^[13]的方法,称取 2.0 g 脱脂后的果实粉末,置于 250 mL 圆底烧瓶中,加入体积分数 55%乙醇至料(g)液(mL)比为 1:45,充分混合,在 50 ℃水浴条件下提取 2 h,过滤,将滤液在 55 ℃条件下浓缩后,加入体积分数 60%乙醇溶液定容至 50 mL。采用亚硝酸钠-硝酸铝分光光度法测定总黄酮含量^[14],用 OD_{510 nm} 值表示。

1.4 苹果幼果总 RNA 的提取及其反转录

取冻存的苹果幼果,采用改良的 CTAB-LiCl 法^[15]提取苹果幼果总 RNA,用微量紫外分光光度计对 RNA 的浓度及纯度进行检测。利用 cDNA 试剂盒,将各质量浓度 ALA 处理后不同时间采集的苹果幼果总 RNA 反转录成单链 cDNA,并将质量浓度统一稀释至 50 ng/mL。

1.5 苹果幼果中 *CHS* 和 *CHI* 基因相对表达量的测定

苹果 *CHS* 和 *CHI* 基因引物参照 Harb 等^[16]的引物序列设计,以苹果管家基因 β -actin 为内参,上述引物的序列见表 1,均委托上海生工生物技术有限公司合成。

表 1 苹果幼果中 *CHS* 和 *CHI* 基因荧光
定量 PCR 的引物序列

基因名称 Gene name	引物序列 5'→3' Primer sequence (5'→3')
<i>CHS</i>	F:GCAAGTGTGTGTCAGATTACGG
	R:TGATACTGGTGTCTTCAAGCAG
<i>CHI</i>	F:GCTACAAATGCGGTGATAGAA
	R:TACCTTGGTTTCCAATTTTTCATT
β actin	F:ATCGTGGTCATTGGCCATGT
	R:AGCCTGTGAGGTTCCAGTAATCAT

荧光定量 PCR 以 SYBR 为荧光染料,采用 20 μ L 体系:10.0 μ L SYBR premix Ex TaqTM (2 $\times$) 反应液,0.4 μ L RcxDag (2 $\times$),上、下游引物各 0.8

μL , cDNA 模版 $2\ \mu\text{L}$, 补加 ddH_2O 至 $20\ \mu\text{L}$ 。混匀, 离心, 放入 PCR 仪扩增, 反应程序为: $95\ ^\circ\text{C}$ 变性 $30\ \text{s}$; $95\ ^\circ\text{C}$ $5\ \text{s}$, $60\ ^\circ\text{C}$ $34\ \text{s}$, 40 个循环。反应中设置空白对照, 使用双蒸水为模版。每个样品重复 3 次。反应结束后记录 C_t 值, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[17] 进行数据分析。

1.6 数据处理

试验数据采用 Excel 进行处理和作图, 用 SPSS 18.0 软件进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 苹果幼果黄酮含量的变化

苹果幼果总黄酮含量(用 $\text{OD}_{510\ \text{nm}}$ 表示)检测结果如图 1 所示。在 ALA 质量浓度为 $0\sim 300\ \text{mg/L}$ 时, 苹果幼果中的黄酮含量随 ALA 质量浓度的升高

而升高, 在 ALA 质量浓度为 $400\ \text{mg/L}$ 时黄酮含量开始有所下降, 表明 $300\ \text{mg/L}$ 为 ALA 处理的最佳质量浓度。由图 1 还可知, 苹果幼果中的黄酮含量随着处理后时间的延长而升高, 于处理后 $12\ \text{d}$ 达到最高。

在用不同质量浓度 ALA 处理后于同一时间采集幼果, 可知苹果幼果中的黄酮含量随 ALA 质量浓度的增加均表现出增长趋势; 用同一质量浓度 ALA 处理不同时间, 苹果幼果中的黄酮含量表现出显著差异, 尤其是在 ALA 质量浓度为 $300\ \text{mg/L}$ 时, 苹果幼果中黄酮含量的增长速率最快(与对照相比最高达到 33.33%), 其含量在 $12\ \text{d}$ 时达到最高, 较对照提高 14.29% 。用 ALA 处理苹果幼果后, 幼果黄酮含量总体上表现出增长趋势, 并在质量浓度 $300\ \text{mg/L}$ ALA 处理 $9\ \text{d}$ 后表现最佳。

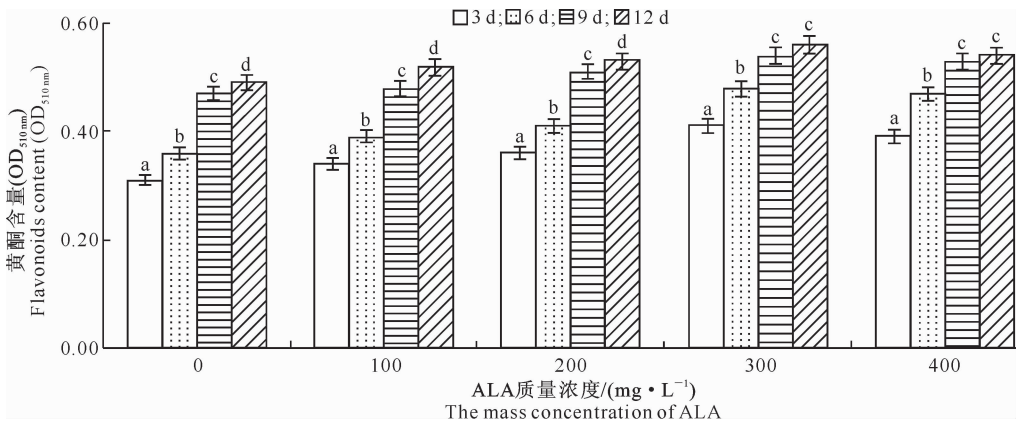


图 1 不同质量浓度 ALA 对苹果幼果黄酮含量($\text{OD}_{510\ \text{nm}}$)的影响
柱上标不同小写字母表示同一质量浓度 ALA 处理后不同时间幼果黄酮含量($\text{OD}_{510\ \text{nm}}$)差异显著($P<0.05$)

Fig. 1 Effects of ALA concentrations on contents of flavonoids ($\text{OD}_{510\ \text{nm}}$) in young apples

Different small letters indicate significant difference between different processing times at same ALA concentration ($P<0.05$)

2.2 苹果幼果总 RNA 的检测

用改良 CTAB 法提取苹果果实的总 RNA, 结果如图 2 所示。

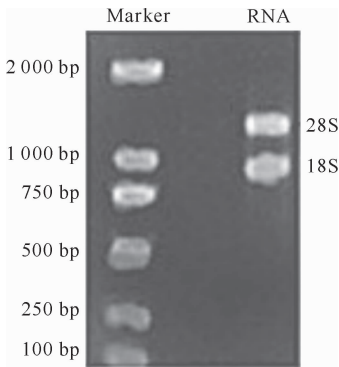


图 2 用改良 CTAB 法提取的苹果幼果总 RNA
Fig. 2 Total RNA measured by improved CTAB method
图 2 表明, 28S 和 18S RNA 条带清晰, 28S 亮

度约是 18S 的 2 倍, 无明显的降解痕迹, 说明 RNA 分子完整性良好。 A_{260}/A_{280} 为 $1.9\sim 2.1$, 表明样品纯度较高。因此, 所获得的 RNA 样品在完整性和纯度方面都符合要求, 可用于后续试验。

2.3 苹果幼果中 *CHS* 和 *CHI* 基因的相对表达量

用荧光定量 PCR 方法检测苹果幼果体内黄酮合成相关基因 *CHS* 和 *CHI* 在不同质量浓度 ALA 处理及处理后不同时间相对表达量的变化, 结果如图 3、4 所示。由图 3、4 可知, 两者的表达规律基本相同: 在 ALA 质量浓度 $<300\ \text{mg/L}$ 时, 2 种基因相对表达量变化不大; 在 ALA 质量浓度为 $300\ \text{mg/L}$ 时, 二者相对表达量达到最大; 在 ALA 质量浓度为 $400\ \text{mg/L}$ 时, 2 种基因相对表达量开始有所下降。总体上看, 随 ALA 质量浓度的增大, 2 种基因的相对表达量均表现为上调趋势。从 ALA 处理后不同时间 2 种基因的相对表达量来看: 处理后 $3\sim 9\ \text{d}$ 表

达量显著上升,9 d 时表达量达到最高,12 d 时表达量有所降低。用 300 和 400 mg/L ALA 处理时,2 种基因在处理不同时间相对表达量波动较大,特别是 300 mg/L ALA 处理 9 d 后,*CHS* 和 *CHI* 2

种基因的相对表达量分别是处理后 12 d 的 1.61 和 1.31 倍。因此,ALA 处理苹果幼果的最佳质量浓度为 300 mg/L,最佳采集时间为喷洒后 9 d。

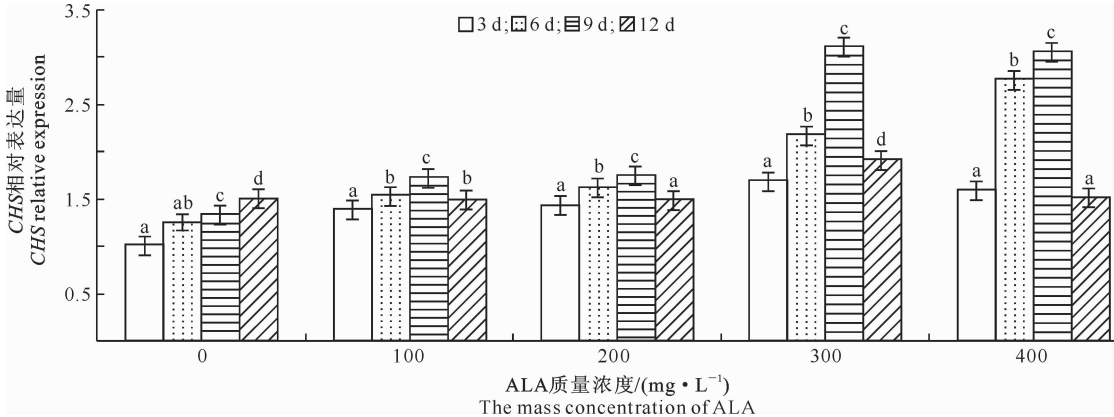


图 3 不同质量浓度 ALA 对苹果幼果 *CHS* 基因相对表达量的影响

柱上标不同小写字母表示同一质量浓度 ALA 处理后不同时间 *CHS* 基因相对表达量差异显著($P<0.05$)

Fig. 3 Effects of ALA concentrations on expression of *CHS* relative expression in young apples

Different small letters indicate significant difference between different processing times at same ALA concentration ($P<0.05$)

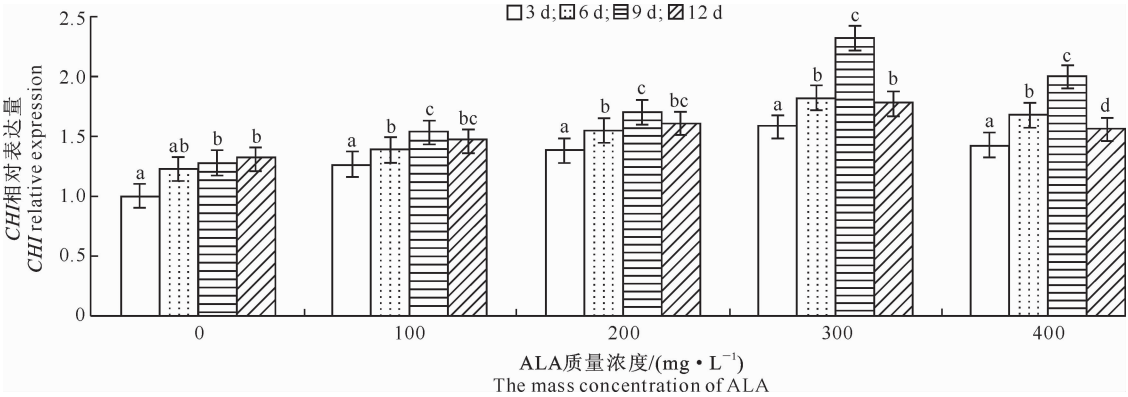


图 4 不同质量浓度 ALA 对苹果幼果 *CHI* 基因相对表达量的影响

柱上标不同小写字母表示同一质量浓度 ALA 处理后不同时间 *CHI* 基因相对表达量差异显著($P<0.05$)

Fig. 4 Effects of ALA concentrations on expression of *CHI* relative expression in young apples

Different small letters indicate significant difference between different processing times at same ALA concentration ($P<0.05$)

3 讨 论

本研究结果显示,用不同质量浓度 ALA 处理苹果幼果后,幼果体内的黄酮含量及 *CHS* 和 *CHI* 基因相对表达量均有显著变化,且呈现出相同的规律,即 ALA 质量浓度为 100~300 mg/L 时,上述 3 项指标均明显递增,ALA 质量浓度为 400 mg/L 时又均开始出现下降趋势。苹果幼果黄酮总体上表现出明显的上升趋势,并在质量浓度为 300 mg/L ALA 处理 9 d 时达到较高水平。不同质量浓度 ALA 对苹果幼果黄酮含量及 *CHS*、*CHI* 表达量的影响均表现出先增后减的作用。这一现象再次证

明,ALA 在低质量浓度下能够促进植物代谢,在高质量浓度下则会抑制植物代谢^[18]。同时,用同一质量浓度 ALA 处理幼果后不同时间,苹果幼果体内的黄酮含量及 *CHS*、*CHI* 基因表达量均在处理后 3~9 d 递增,至 12 d 时 *CHS*、*CHI* 基因表达量与 9 d 时相比均出现大幅下降,而黄酮含量仍在上升,这是由于幼果体内的黄酮仍在递增积累,只是其递增速率有明显下降。上述现象可能是因为随着处理时间的延长,ALA 被完全吸收或损耗,不能持续刺激苯丙烷代谢系统继续代谢。这一现象说明,ALA 的最佳效果期为处理后 6~9 d。因此,建议在生产实践中,尽量在疏果期前 6~9 d,选用 300 mg/L

ALA 处理苹果幼果,以保证幼果中黄酮的快速积累。

另外,本研究中苹果幼果黄酮含量的变化规律与 *CHS*、*CHI* 基因的表达规律相吻合,这一现象也与前人的研究结果^[6,19]相同,并再次验证了“基因控制酶的合成,酶控制产物的合成”这一生物学规律。ALA 刺激了苹果体内苯丙烷的代谢途径,增加了关键酶 *CHS*、*CHI* 基因的表达量,进而提高了酶活性,并调控黄酮类物质的代谢,从而促进了黄酮物质的生物合成^[20]。

4 结 论

用 ALA 处理苹果幼果,在其质量浓度 ≤ 300 mg/L 时,随着 ALA 质量浓度的增大,幼果中的黄酮含量及 *CHS*、*CHI* 相对表达量均呈升高趋势,在 ALA 为 400 mg/L 时上述各项指标均表现出下降趋势;ALA 处理后,苹果幼果中的黄酮含量及 *CHS*、*CHI* 相对表达量均较未经 ALA 处理幼果明显提高,并大多在处理 9 d 达到最高值,12 d 后开始下降。在生产实际中,为了提高苹果幼果的黄酮含量,应尽量在疏果前 6~9 d,选用 300 mg/L ALA 处理幼果,以提高疏果中的黄酮含量,为保证从苹果疏除果中提取黄酮奠定基础。

[参考文献]

- [1] 李琳玲,程 华,许 峰.植物查尔酮异构酶研究进展 [J]. 生物技术通讯,2008,6(19):935-937.
Li L L, Cheng H, Xu F. Progress of chalcone isomerase in plants [J]. Letters in Biotechnology, 2008, 6(19): 935-937. (in Chinese)
- [2] 李 楠,刘 元,侯滨滨.黄酮类化合物的功能特性 [J]. 食品研究与开发,2005,26(6):139-141.
Li N, Liu Y, Hou B B. The functional characteristics of flavonoids [J]. Food Research and Development, 2005, 26(6): 139-141. (in Chinese)
- [3] Podsedek A, Wilska-Jeska J, Anders B, et al. Compositional characterisation of some apple varieties [J]. European Food Research and Technology, 2000, 210: 268-272.
- [4] Sun L J, Guo Y R, Fu C C, et al. Simultaneous separation and purification of total polyphenols, chlorogenic acid and phlorizin from thinned young apples [J]. Food Chemistry, 2013, 136: 1022-1029.
- [5] Von Wettstein D, Gough S, Kananagara C G. Chlorophyll biosynthesis [J]. Plant Cell, 1995, 7: 1039-1057.
- [6] 汪良驹,姜卫兵,章 镇,等. 5-氨基乙酰丙酸生物合成和生理活性及其在农业生产中的潜在应用 [J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(3): 185-192.
Wang L J, Jiang W B, Zhang Z, et al. Biosynthesis and physio-

- logical activities of 5-Aminolevulinic Acid (ALA) and its potential application in agriculture [J]. Plant Physiology Communications, 2003, 39(3): 185-192. (in Chinese)
- [7] 汪良驹,王中华,李志强,等. 5-氨基乙酰丙酸促进苹果果实着色的效应 [J]. 果树学报, 2004, 21(6): 512-515.
Wang L J, Wang Z H, Li Z Q, et al. Effect of 5-Aminolevulinic acid on enhancing apple fruit coloration [J]. Journal of Fruit Science, 2004, 21(6): 512-515. (in Chinese)
- [8] Bindu C R, Vivekanandan M. Role of aminolevulinic acid in improving biomass production in *Vigna catjung*, *Vmung* and *V radiate* [J]. Biol Plant, 1998, 41: 211-215.
- [9] 马艳玲,吴凤芝. 枯萎病菌对不同抗性黄瓜品种苯丙氨酸解氨酶的影响研究 [J]. 沈阳农业大学学报, 2006, 37(3): 335-338.
Ma Y L, Wu F Z. Effect of *Fusarium wilt* pathogen on Phenylalanine Ammonia-lyase of cucumber cultivars with different resistance [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2006, 37(3): 335-338. (in Chinese)
- [10] 孟繁静. 植物花发育的分子生物学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 225-256.
Meng F J. Molecular biology of plant flower development [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 225-256. (in Chinese)
- [11] Holton T A. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis [J]. Plant Cell, 1995, 7: 1071-1121.
- [12] Li S J, Deng X M, Mao H Z, et al. Enhanced anthocyanin synthesis in foliage plant *caladium biocolor* [J]. Plant Cell Report, 2005, 23: 716-720.
- [13] 克热木江·吐尔逊江,努尔阿米娜·阿布都肉苏,吐尔逊娜依·迪力夏提. 新疆野苹果果实中总黄酮的提取工艺 [J]. 食品科学, 2012, 33(10): 20-23.
Tursunjan K, Abdurusul N, Dilxat T. Extraction of total flavonoids from *Malus sieversii* fruits [J]. Food Science, 2012, 33(10): 20-23. (in Chinese)
- [14] 董彩文,梁少华,汤风雨,等. 苹果渣中总黄酮的提取及其抑菌活性研究 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(27): 11631, 11662.
Dong C W, Liang S H, Tang F Y, et al. Study on the extraction of total flavonoids from apple pomace and its antibacterial activity [J]. Journal of Anhui Agri Sci, 2008, 36(27): 11631, 11662. (in Chinese)
- [15] Gasic K, Hernandez A, Korban S S. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction [J]. Plant Molecular Biology Report, 2004, 22: 437-438.
- [16] Harb J, Saleh O, Kitzemann D, et al. Upregulation of polyphenol related genes prevents ‘skin burning’ of well-colored ‘Cameo’ apples stored under stressful controlled atmosphere conditions [J]. Postharvest Biology and Technology, 2013, 77: 121-127.
- [17] Livak K 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.

Huang X P,Zhong G Y,Zhang X M,et al. Determination of aurantio-obtusin and chrysophanol in Cassiae Semen by HPLC [J]. Chinese Materia Medica,2008,35(16):2065-2067. (in Chinese)

[13] 袁 晓,高俊飞,舒楚金,等. 不同产地决明子中 9 种蒽醌类成分的测定 [J]. 中草药,2012,43(9):1773-1775.
Yuan X,Gao J F,Shu C J,et al. Determination of nine anthraquinones in Cassiae Semen from different habitats [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs,2012,43(9):1773-1775. (in Chinese)

[14] 赵玉锦,赵 琦,白志良,等. 空间诱变高粱突变体的研究 [J]. 植物学通报,2001,18(1):81-89.
Zhao Y J,Zhao Q,Bai Z L,et al. Study on sorghum mutant induced by space flight [J]. Chinese Bulletin of Botany,2001,18(1):81-89. (in Chinese)

[15] 郑积荣,汪炳良,王世恒,等. 飞船搭载番茄种子 SP₁ 的生物学效应 [J]. 核农学报,2004,18(4):311-313.
Zheng J R,Wang B L,Wang S H,et al. The biological effect of SP₁ tomatos after boarding on airship [J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica,2004,18(4):311-313. (in Chinese)

[16] 曹墨菊,荣廷昭,潘光堂. 空间条件对玉米主要农艺性状的影响 [J]. 中国农学通报,2000,16(2):14-16.
Cao M J,Rong T Z,Pan G T. The influences of space condition on the agronomic characters of maize [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2000,16(2):14-16. (in Chinese)

[17] 王志芬,单成钢,苏学合,等. 丹参种子航天搭载的诱变效应研究 [J]. 现代中药研究与实践,2007,21(4):6-8.
Wang Z F,Shan C G,Su X H,et al. Mutation effects on SP₁ dry seed of *Salvia miltiorrhiza* Bge. by space carrying [J]. Research and Practice of Chinese Medicines,2007,21(4):6-8. (in Chinese)

[18] 任卫波,韩建国,张蕴薇,等. 卫星搭载对二色胡枝子生物学特性的影响 [J]. 草地学报,2006,14(2):112-115.
Ren W B,Han J G,Zhang Y W,et al. Effects of spaceflight on characteristics of *Lespedeza bicolor* [J]. Acta Agrestia Sinia,2006,14(2):112-115. (in Chinese)

[19] 单成钢,王志芬,苏学合,等. 航天诱变黄芩种子对其 SP₁ 代的影响 [J]. 核农学报,2008,22(2):188-191.
Shan C G,Wang Z F,Su X H,et al. SP₁ biological effects of space inducement on *Scutellaria baicalensis* [J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica,2008,22(2):188-191. (in Chinese)

[20] 孙野青,李玉芬,陈 岩,等. 空间环境对青椒和番茄遗传诱变研究 [J]. 植物研究,1997,17(2):184-189.
Sun Y Q,Li Y F,Chen Y,et al. Studies on inheritance and variation of pepper and tomato of spaceflight breeding [J]. Bulletin of Botanical Research,1997,17(2):184-189. (in Chinese)

[21] 李金贵,朱 奎,谷文英,等. 航天搭载对牛膝 SP₁ 化学成分的影响 [J]. 中国中药杂志,2008,33(10):1161-1163.
Li J G,Zhu K,Gu W Y,et al. Effects of chemical constituent in roots of *Achyranthes bidentata* [J]. Chinese Materia Medica,2008,33(10):1161-1163. (in Chinese)

(上接第 165 页)

[18] Bindu R C,Vivekanandan M. Hormonal activities of 5-aminolevulinic acid in callus induction and micropropagation [J]. Plant Growth Regul,1998,26:15-18.

[19] 王中华,汤国辉,李志强,等. 5-氨基乙酰丙酸和金雀异黄素促进苹果果皮花青素形成的效应 [J]. 植物生理学通讯,2006,39(3):321-327.
Wang Z H,Tang G H,Li Z Q,et al. Promotion of 5-aminolevulinic acid and genistein on anthocyanin accumulation in apples [J]. Plant Physiology Communication,2006,39(3):321-327. (in Chinese)

[20] 刘 金,魏景立,刘美艳,等. 早熟苹果花青苷积累与其相关酶活性及乙烯生成之间的关系 [J]. 园艺学报,2012,39(7):1235-1242.
Liu J,Wei J L,Liu M Y,et al. The relationships between the enzyme activity of anthocyanin biosynthesis,ethylene release and anthocyanin accumulation in fruits of precocious apple cultivars [J]. Acta Horticulturae Sinica,2012,39(7):1235-1242. (in Chinese)