

外源 IAA 对核桃内果皮生长发育的影响¹

李义霞^{1,2,3}, 鱼尚奇^{1,2}, 郭众仲^{1,2,3}, 付嘉智^{1,2,3}, 鹿宏丽^{1,2,3}, 王红霞⁴, 张锐^{1,2,3*}, 木塔力甫^{1,2,3}

(¹新疆特色果树高效优质栽培与深加工技术国家地方联合工程实验室, 新疆阿拉尔 843300; ²新疆兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室, 新疆阿拉尔 843300; ³塔里木大学园艺与林学院, 新疆阿拉尔 843300; ⁴河北农业大学河北省山区研究所, 河北保定 071033)

摘要: 【目的】探究生长素 (IAA) 对核桃内果皮发育的影响。【方法】采用不同浓度的 IAA 处理核桃, 通过 Wiesner 法观察核桃内果皮木质素的沉积变化, 并测定内果皮中木质素、纤维素、半纤维素和 IAA 含量, 同时对 IAA 处理后第 12 天的样本进行高通量测序。【结果】与对照相比, 低浓度 IAA 处理和高浓度 IAA 处理后内果皮木质素的积累存在显著差异, 在处理后期, 核桃内果皮部分硬化, 仍存在内果皮缺失或不完整现象。木质素、纤维素和半纤维素含量整体呈上升趋势, 最高分别可达 30.55%、16.49% 和 17.23%, IAA 含量整体呈上升趋势; 通过 RNA-seq 分析, 发现差异基因主要富集在植物激素信号转导和苯丙烷生物合成途径中, 且随着 IAA 使用浓度的升高, 部分与激素信号转导和苯丙烷生物合成相关的差异表达基因逐渐下调表达或不表达, 【结论】IAA 参与调控核桃内果皮的发育, 影响内果皮木质素的积累, 为后期研究外源生长素对核桃内果皮的响应提供参考依据。

关键词: 核桃; 内果皮; IAA; 木质素; 高通量测序

中图分类号: S664.1 文献标志码: A 文章编号: 1009-9980(2024)04-0001-08

Effect of exogenous IAA on the growth and development of walnut endocarp

LI Yixia^{1, 2, 3}, YU Shangqi^{1, 2}, GUO Zhongzhong^{1, 2, 3}, FU Jiazhi^{1, 2, 3}, LU Hongli^{1, 2, 3}, WANG Hongxia⁴, ZHANG Rui^{1, 2, 3*}, Mutellip^{1, 2, 3}

(¹The National-Local Joint Engineering Laboratory of High Efficiency and Superior-Quality Cultivation and Fruit Deep Processing Technology on Characteristic Fruit Trees, Alar 843300, Xinjiang, China; ²Key Laboratory for the Protection and Utilization of Biological Resources in the Tarim Basin of Xinjiang Production and Construction Corps, Alar 843300, Xinjiang, China; ³College of Horticulture and Forestry, Tarim University, Alar 843300, Xinjiang, China; ⁴Hebei Institute of Mountain Research, Hebei Agricultural University, Baoding 071033, Hebei, China)

收稿日期: 2023-12-13

接受日期: 2024-01-31

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32160689); 新疆重点产业创新发展支撑计划 (2022DB022); “天山英才”培养计划

作者简介: 李义霞, 在读硕士研究生, 研究方向为果树种质资源与品种选育。Tel: 18699745269, E-mail: 1542236952@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 15292502816, E-mail: zhrqsh@163.com

Abstract: **【Objective】** The accumulation of lignin is the main process of walnut endocarp development, and plant hormones in the formation of thick-walled tissues and the synthesis of lignin can be involved in xylem development through the expression of genes related to the regulation, thus affecting the development of the secondary wall, in order to understand the effect of the growth hormone IAA on the development of endocarp in walnuts. **【Methods】** In the present study, we selected the trees of age of 16, with robust and consistent growth and consistent levels of water and fertilizer management level consistent trees. At about 50 d after flowering, walnut short fruiting branches were wrapped and treated with different concentrations of growth factors. Changes in lignin deposition in the endocarp of walnuts after treatment with different concentrations of IAA were observed by resorcinol staining, and the contents of lignin, cellulose, hemicellulose, IAA in the endocarp were determined, and at the same time, samples from the 12th d of IAA treatment were subjected to high-throughput sequencing and analyzed. **【Results】** The results showed that at the early stage of treatment, there was a significant difference in the accumulation of endocarp lignin between the low concentration IAA treatment and the high concentration IAA treatment, with the deposition starting first from near the vascular bundles, and the color shifting from light red to dark red, and from local staining to overall staining; at the late stage of treatment, the endocarp of the late walnuts was partially hardened and significantly thickened, but the development of the endocarp was incomplete, and the dewy kernel was still present. By determining the lignin, cellulose and hemicellulose contents, it was found that the endocarp lignin content increased significantly after treatment with 50 mg·L⁻¹ IAA and 100 mg·L⁻¹ IAA on the 12th d after treatment, and that the difference between the lignin content and the control was not obvious after 200 mg·L⁻¹ IAA treatment. In the late treatment period, low concentration IAA treatment promoted lignin accumulation and lignin content increased slowly, and endocarp lignin content was lower than control after high concentration IAA treatment. The overall endocarp cellulose content showed an increasing trend, compared with CK, the pre-cellulose content was higher than the control after different concentrations of IAA treatment; compared with CK, the overall endocarp hemicellulose content showed an increasing trend. The endogenous IAA content of walnut endocarp after different concentrations of IAA treatments showed an overall increasing trend. On the 12th d after treatment, the endogenous IAA content of walnut endocarp after 50 mg·L⁻¹ IAA and 100 mg·L⁻¹ IAA treatments was significantly higher than that of the control, and the IAA content of the endocarp after 50 mg·L⁻¹ IAA treatments amounted to 37.77 ng·g⁻¹, which was 24.2% higher than that of the control, and that of the endocarp after 100 mg·L⁻¹ IAA treatment was 21.5% higher than the control, 150 mg·L⁻¹ IAA and 200 mg·L⁻¹ IAA were lower than the control, and with the increase of concentration, the IAA content showed a decreasing trend. The different concentrations of growth hormone IAA and water (control CK) were compared to each other to screen for differential genes, and it was found that the number of differentially expressed genes after 50 mg·L⁻¹ IAA vs CK treatment was the largest, with 3,292 genes, of which 1,922 were up-regulated genes and 1,370 were down-regulated

genes, and the common differential genes among the different concentrations were 591 genes through the Venn diagram. expressed genes were 591. The GO enrichment and KEGG enrichment analyses revealed that the phytohormone signaling pathway was the common metabolic pathway, and the phenylpropane biosynthesis pathway was significantly altered with the increase of concentration, and it was not enriched in the treatments of 150 mg·L⁻¹ IAA and 200 mg·L⁻¹ IAA; it was initially hypothesized that there were significant differences in the phytohormone signaling and phenylpropane biosynthesis metabolic pathways in the endocarp of walnuts after exogenous application of growth factors, so the above two pathways were investigated and analyzed. Therefore, statistical analysis of the genes related to the above two pathways showed that some of the differentially expressed genes related to hormone signaling and phenylpropane biosynthesis were gradually down-regulated or non-expressed with the increase of concentration.【Conclusion】The results showed that IAA affected the accumulation of lignin and lignin content of endocarp, as well as the expression of differentially expressed genes in the lignin synthesis pathway, which provided a reference basis for the later study of the mechanism of exogenous growth hormone's effect on walnut endocarp.

Key words: Walnuts; Endocarp; IAA; Lignin; High throughput sequencing

随着核桃产业的发展,受品种特性及外界环境的影响,一些核桃品种出现了内果皮发育不完整、局部组织缺失的现象,导致核仁裸露,影响采后运输、加工和储藏等,进而影响种仁的品质与营养,其中新露核桃露仁特性较为突出(图 1-A),果实形状近椭圆形,平均坚果壳厚度为 1.28 mm,种仁易分离。

木质素的积累是核桃内果皮生长发育的重要过程,也是植物细胞壁中提供较强机械支撑作用的结构因子之一^[1]。前期研究发现,影响细胞壁形成的因素众多,其中激素起突出作用^[2-3],能够通过参与木质部发育对相应的基因进行表达和调节,进而影响到次生壁的形成^[4-5]。乙烯和生长素可促进棉花胚珠细胞壁的沉积,此外,乙烯和生长素反应减少,会促进纤维素生物合成,促使细胞壁形成^[6]。菊花茎节间中 *CmHLB* 基因的表达量与木质素含量和茎秆强度的增加趋势相一致^[7]。*AP2/ERF* 可以调节木质素生物合成和木质部细胞分化,改变白杨木质素和纤维素的组成^[8],转录因子 *ARF3* 和 *ARF6* 结合编码 *4CL* 和 *CCoAOMT2* 基因的启动子区域激活其转录水平,促进木质素的合成。不同浓度的生长素,对细胞壁形成的影响程度不同,例如,在拟南芥和百日草中,生长素刺激叶肉细胞分化为木质部管状细胞,同时抑制花粉细胞壁的增厚^[9];外源 IAA 取代顶端茎诱导向日葵形成层细胞分裂和次生木质部分化;此外,生长素的浓度梯度在发育中的木材组织中保持不变,为分生组织的发育提供位置信息^[10],已在拟南芥根和茎分生组织的发育中证实^[11]。维管形成层是运输生长素的主要腔室^[12],*PttPIN1* 和 *PttPIN2* 基因表达位于形成层分生组织和扩张的木质部衍生物,而其在杨树茎生长素的极地运输发挥关键作用^[13]。蒋旭等^[14]通过试验证明 *MsNS* 能够调控植物木质素和纤维素的合成,对于白桦,外源 *GA₃* 通过上调 *NAC* 和 *MYB* 转录因子调控 *CESA*、*PAL* 和 *GA*

氧化酶等基因的表达,从而促进木质部的发育^[15],喷施适宜浓度的 MeJA 和茉莉酸甲酯可提高根系内源激素和木质素含量,增强植株的抗逆性和 PAL 活性, PAL、C4H、CCR1 和 CAD2 基因在烟叶木质素的合成和积累中起关键调控作用^[16-17];叶面喷施适宜浓度的多效唑^[18],可通过阻抑 IAA 合成,从而抑制幼苗纵向生长,使植株变矮,并增强抗性。IAA 可提高临沧云烟和菜豆豆荚中木质素合成关键酶的活性从而促进木质素合成^[19-20]。

前期研究发现在早期新露核桃内果皮壳质态中 IAA 浓度远低于肉质态中的浓度,硬化的后期又开始升高^[21],且木质素对核桃内果皮的形成、核桃品质的改善起至关重要的作用,不同的外源激素处理对木质素积累作用不同。因此,笔者在本研究中探讨 IAA 与核桃内果皮形成的关系,为减少露仁的发生提供理论依据,制定合理的生产措施。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验材料新露(露仁品种)采自于阿克苏地区温宿县实验林场。选取树龄均为 16 a(年),株行距为 5 m×6 m,生长健壮一致,水肥管理水平一致的树体。于花后约 50 d(2022 年 6 月 3 日)硬化期刚开始时,使用不同浓度(0、50、100、150、200 mg·L⁻¹ IAA)5 个激素水平的生长素,选取果实大小基本一致的短结果枝,在靠近果实的短果枝顶部上侧,用手术刀刮去约 0.5 cm×2.0 cm 大小的外表皮。用棉棒沾取适量激素均匀涂抹在伤口上,并用浸泡过激素的脱脂棉将伤口填充,封口膜包裹伤口,使伤口与外界环境隔离。从首次激素处理开始,每隔 12 d 采摘 1 次果实,直至硬化期结束,共采样 4 次。采集的果实全部在低温无菌条件下分离出内果皮硬化组织作为试验样本,将各样本材料迅速切至颗粒状,液氮速冻后放至超低温冰箱保存,将部分样本送至深圳微科盟科技集团有限公司进行测序,并对所得的数据进行分析。

1.2 试验方法

1.2.1 木质素沉积变化分析

采用间苯三酚染色法^[21]观察内果皮木质素沉积变化。

1.2.2 木质素、纤维素、半纤维素含量分析

分别取经不同浓度生长素 IAA 处理后的内果皮硬化组织样本,参考赵玉雪等^[22]的方法进行测定木质素含量、纤维素、半纤维素含量。

1.2.3 内源 IAA 含量分析

参考燕雪蒙^[23]的方法,测定 IAA 含量。

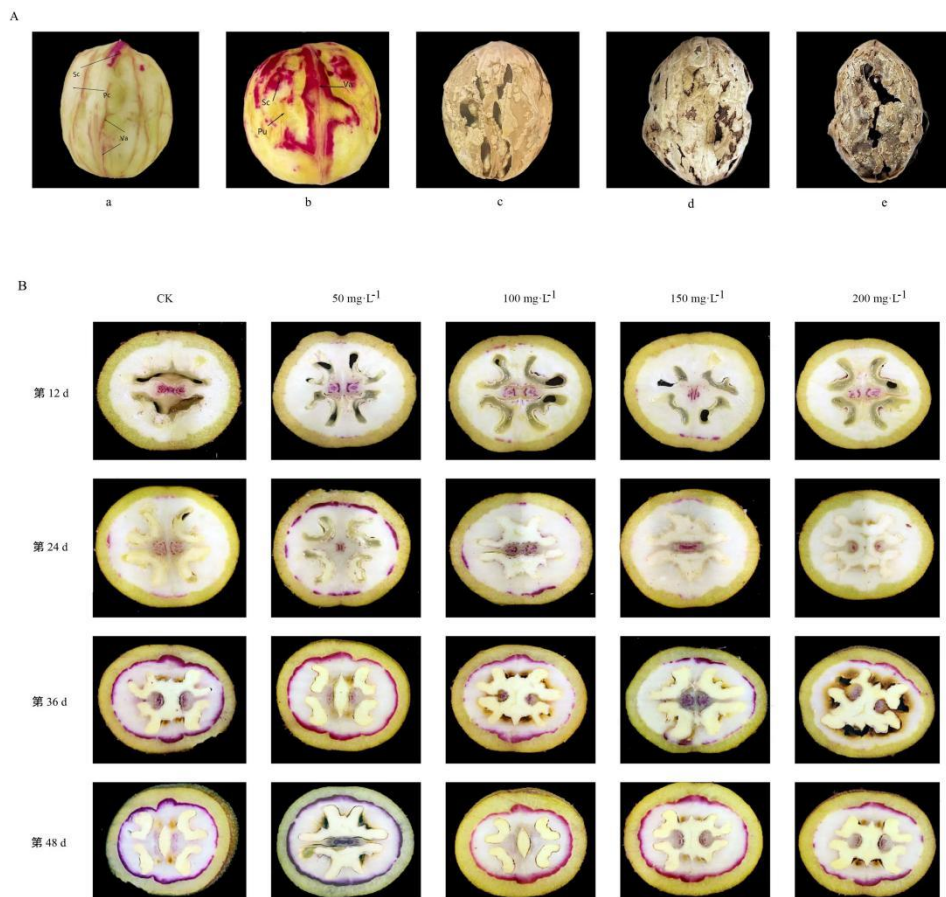
1.2.4 转录组测序

委托深圳微科盟科技集团有限公司对经 50、100、150、200 mg·L⁻¹ IAA 处理后的 12 d 核桃内果皮样品和对照组核桃内果皮进行转录组测序。

2 结果与分析

2.1 IAA 对核桃内果皮木质素沉积变化的影响

采用间苯三酚染色法观察核桃硬化期内果皮木质素沉积变化，如图 1-B 所示，核桃内果皮在硬化的过程中，木质素的沉积发生了显著变化。硬化初期，木质素从靠近维管束的位置先开始沉积，颜色从浅红转为深红，从局部染色转为整体染色，直到硬化期结束核桃的硬壳完全形成。在经过 IAA 处理 12 d 之后，低浓度 IAA 处理和高浓度 IAA 处理的效果存在明显差异，特别是在接近缝合线的区域，首次呈现出粉红色，而且这种颜色的深浅不一，这表明内果皮已经开始沉淀木质素。在 24 d 时，木质素还未大量积累，仅在内果皮和中果皮的交界处呈现。相较于对照组，50 mg·L⁻¹ IAA 和 100 mg·L⁻¹ IAA 处理后的核桃内果皮的木质素沉积染色区域明显增加，而高浓度 IAA 处理效果不显著，染色区域的面积较少。IAA 处理 36 d，核桃的内部果皮形状已经大致呈现出粉红色，这表明此刻已经积累了大量的木质素，并且与对照组相比，在低浓度 IAA 处理后，木质素的积累不明显。处理后 48 d，核桃内果皮完全硬化，并且明显变厚，颜色也更深。虽核桃内果皮中有大量木质素沉积，但是发育并不完整，存在露仁的情况，表明 50 mg·L⁻¹ IAA 处理后，前期可促进核桃内果皮木质素的积累，150 mg·L⁻¹ IAA 和 200 mg·L⁻¹ IAA 处理后出现不同程度抑制木质素的积累，后期作用并不明显。



A. 新露核桃不同时期核桃内果皮发育的动态变化 (a. 硬化初期; b. 硬化中期; c. 硬化后期; d. 成熟期; e. 贮藏期; Pu. 未硬化区; Sc. 硬化区; Va. 维管束); B. 不同浓度 IAA 处理后木质素沉积变化。

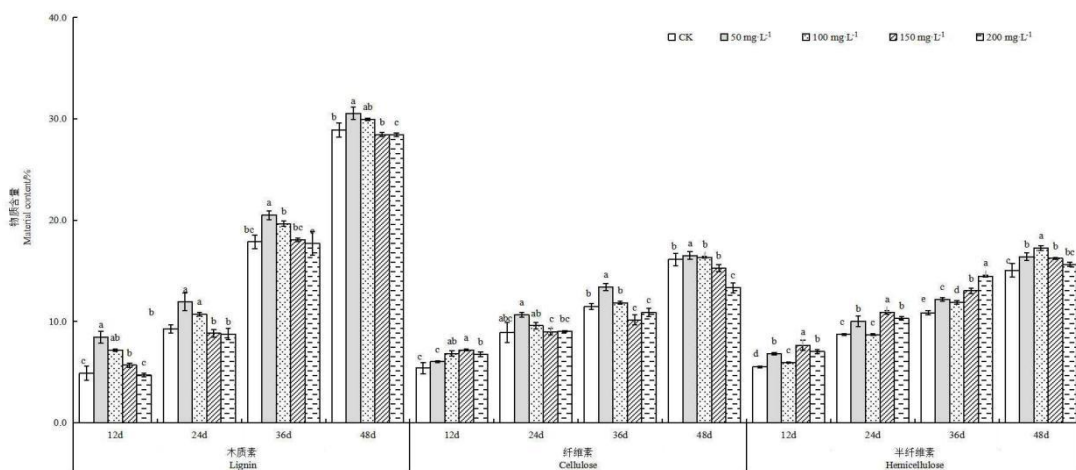
A. Dynamics of endocarp development in Xinlu walnuts at different periods of time (a. Early sclerotization; b. Middle sclerotization; c. Late sclerotization; d. Ripening; e. Storage; Pu. Pulp; Sc. Sclerotic; Va. Vascular bundle);
 B. Changes in endocarp lignin deposition in walnuts after treatment with different concentrations of IAA.

图 1 核桃内果皮发育过程及内果皮木质素沉积变化

Fig. 1 Development process of walnut endocarp and changes in lignin deposition in endocarp

2.2 IAA 对核桃内果皮木质素、纤维素、半纤维素含量的影响

核桃内果皮的生长发育主要包括细胞的分裂、木质化，以及木质素、纤维素和半纤维素等物质含量积累，最终形成厚壁组织。如图 2 所示，处理后 12 d，与对照相比，50 mg·L⁻¹ IAA 和 100 mg·L⁻¹ IAA 处理后内果皮木质素含量显著增加，200 mg·L⁻¹ IAA 处理后，木质素含量与对照差异不明显。处理后期，低浓度 IAA 处理促进木质素积累，木质素含量缓慢增加，高浓度 IAA 处理后内果皮木质素含量低于对照。内果皮中纤维素含量整体呈上升趋势，与对照相比，不同浓度的 IAA 处理后，前期纤维素含量均高于对照；24 d 时，50 mg·L⁻¹ IAA 处理纤维素含量最高，达到 12.49%，36 d 时，50 mg·L⁻¹ IAA、100 mg·L⁻¹ IAA 处理纤维素含量呈上升趋势，150 mg·L⁻¹ IAA 和 200 mg·L⁻¹ IAA 处理纤维素含量显著低于对照；48 d 时，IAA 处理纤维素含量均低于对照。内果皮中半纤维素含量整体呈上升趋势，与对照相比，不同浓度的 IAA 处理后半纤维素含量高于对照，在 36 d 时，200 mg·L⁻¹ IAA 处理半纤维素含量变化上升速率最大并且最高，之后速率有所降低，在 48 d 时，50 mg·L⁻¹ IAA 处理 > 100 mg·L⁻¹ IAA 处理 > 150 mg·L⁻¹ IAA 处理 > 200 mg·L⁻¹ IAA 处理 > 对照，半纤维素含量在 13%~16% 范围变化。



同一处理后天数不同小写字母表示不同浓度差异显著 ($p < 0.05$)，下同。

Different small letters for days after the same treatment indicate significant differences between concentrations ($p < 0.05$), the same below.

图 2 核桃内果皮木质素、纤维素、半纤维素含量变化

Fig. 2 Changes in lignin, cellulose and hemicellulose content of walnut endocarp

2.3 IAA 对核桃内果皮内源 IAA 含量的影响

不同浓度 IAA 处理后核桃内果皮的内源 IAA 含量整体呈上升趋势（图 3-A）。处理后 12 d, 50 mg·L⁻¹ IAA 和 100 mg·L⁻¹ IAA 处理后的核桃内果皮内源 IAA 含量显著高于对照, 50 mg·L⁻¹ IAA 处理后内果皮中 IAA 含量达到 37.77 ng·g⁻¹, 比对照高 24.2%, 100 mg·L⁻¹ IAA 处理后比对照高 21.5%, 150 mg·L⁻¹ IAA 和 200 mg·L⁻¹ IAA 较对照低, 且随着浓度的升高, IAA 含量呈下降趋势; 处理后 24 d, 50 mg·L⁻¹ IAA 处理后, 内果皮中 IAA 含量显著高于对照, 比对照高 8.4%; 处理后期, 各处理间与对照差异小, 但均高于对照。总体来说, 各处理间与对照差异小, 表明外源激素对内源 IAA 在处理后期有一定的作用, 后期作用减弱。

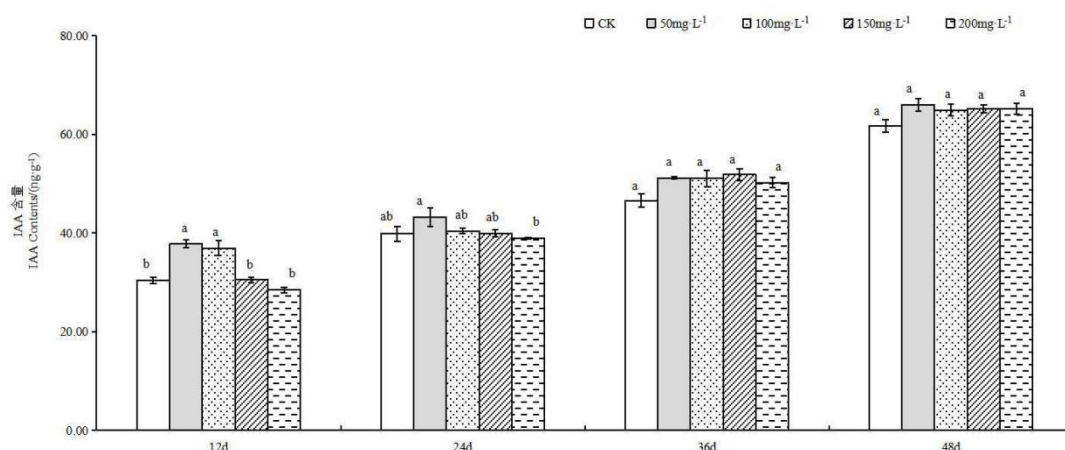


图 3 核桃内果皮 IAA 含量变化

Fig. 3 Changes of IAA content in walnut endocarp

2.4 内果皮转录组数据质量评估

为了解经 IAA 处理后核桃内果皮发育过程中基因的表达情况, 以外源激素处理后 12 d 的核桃内果皮为样品构建 cDNA 文库, 3 个生物重复 (总共 15 个样本) 进行 RNA-Seq 分析, 用 fastp 软件对每一个样本的测序数据 rawdata 做质控处理, 将测序得到的 raw reads 中的接头序列和低质量的 reads 去除后, 获得 clean reads, 测序结果如表 1 所示, Q30 的碱基比例均大于 93%, GC 含量在 45.23%~45.76%, 表明所获得的测序数据是具有高品质和高可靠性。

表 1 RNA 样品质量检测结果

Table 1 Results of RNA sample quality testing

样本名称	样本序列数	样本碱基数	Q20/%	Q30/%	平均长度	GC/%
Sample name	Total reads	Total bases			Mean length	
CK	427 171 96	615 189 685 8	97.81	93.55	144	45.65
CK	414 739 40	597 681 711 1	97.89	93.74	144	45.52
CK	522 603 60	751 761 322 2	97.62	93.10	144	45.54
50 mg·L ⁻¹ IAA-1	559 649 84	802 744 006 5	97.78	93.53	143	45.72

50 mg·L ⁻¹ IAA-2	476 551 22	683 878 560 1	97.68	93.29	143	45.71
50 mg·L ⁻¹ IAA-3	461 139 18	663 747 652 7	97.67	93.23	144	45.46
100 mg·L ⁻¹ IAA-1	423 406 14	610 172 641 5	97.76	93.46	144	45.56
100 mg·L ⁻¹ IAA-2	391 970 92	564 903 623 3	97.84	93.65	144	45.60
100 mg·L ⁻¹ IAA-3	423 780 60	608 482 927 8	97.60	93.12	143	45.54
150 mg·L ⁻¹ IAA-1	435 259 18	626 275 719 7	97.75	93.45	143	45.59
150 mg·L ⁻¹ IAA-2	413 636 52	595 428 828 1	97.76	93.48	144	45.62
150 mg·L ⁻¹ IAA-3	415 993 38	599 483 268 4	97.75	93.47	144	45.58
200 mg·L ⁻¹ IAA-1	411 753 68	593 549 944 1	97.82	93.64	144	45.73
200 mg·L ⁻¹ IAA-2	439 004 76	631 378 928 6	97.80	93.55	143	45.76
200 mg·L ⁻¹ IAA-3	505 937 34	728 398 946 5	97.72	93.39	144	45.71

2.5 差异表达基因分析

分别以不同浓度的生长素 IAA 与清水（对照）处理两两之间进行相互比较筛选差异基因，分别为 50 mg·L⁻¹ vs 对照、100 mg·L⁻¹ vs 对照、150 mg·L⁻¹ vs 对照、200 mg·L⁻¹ vs 对照四组。如图 4 所示，50 mg·L⁻¹ IAA vs 对照处理后差异表达基因数量最多，为 3292 个，其中上调表达的基因有 1922 个，下调表达的基因有 1370 个；200 mg·L⁻¹ IAA 处理后差异表达基因总数最少为 2263 个，且上调表达的基因有 1198 个，下调表达的基因有 1265 个；通过 Venn 图进一步比较 4 个不同浓度的 IAA 处理间的核心差异基因组，发现不同浓度间的共同差异表达基因有 591 个。

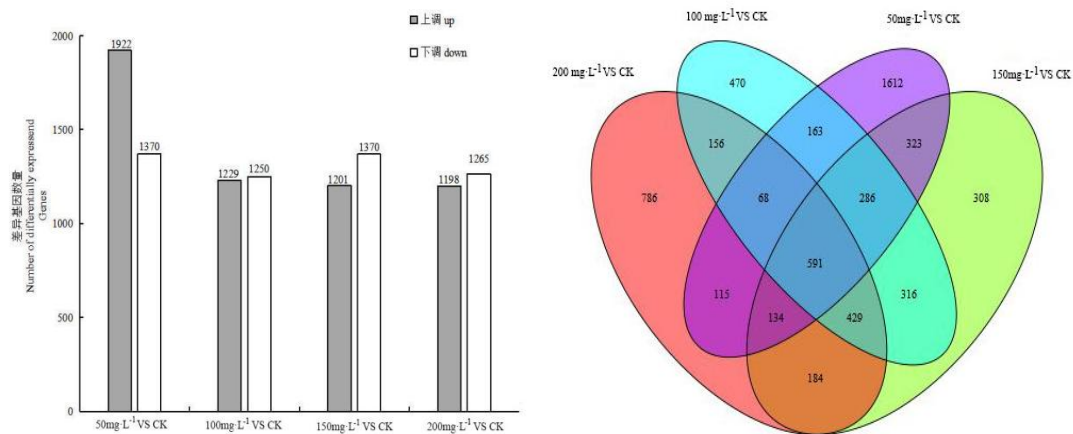


图 4 不同 IAA 处理之间差异表达基因数量图和差异表达基因 Venn 图

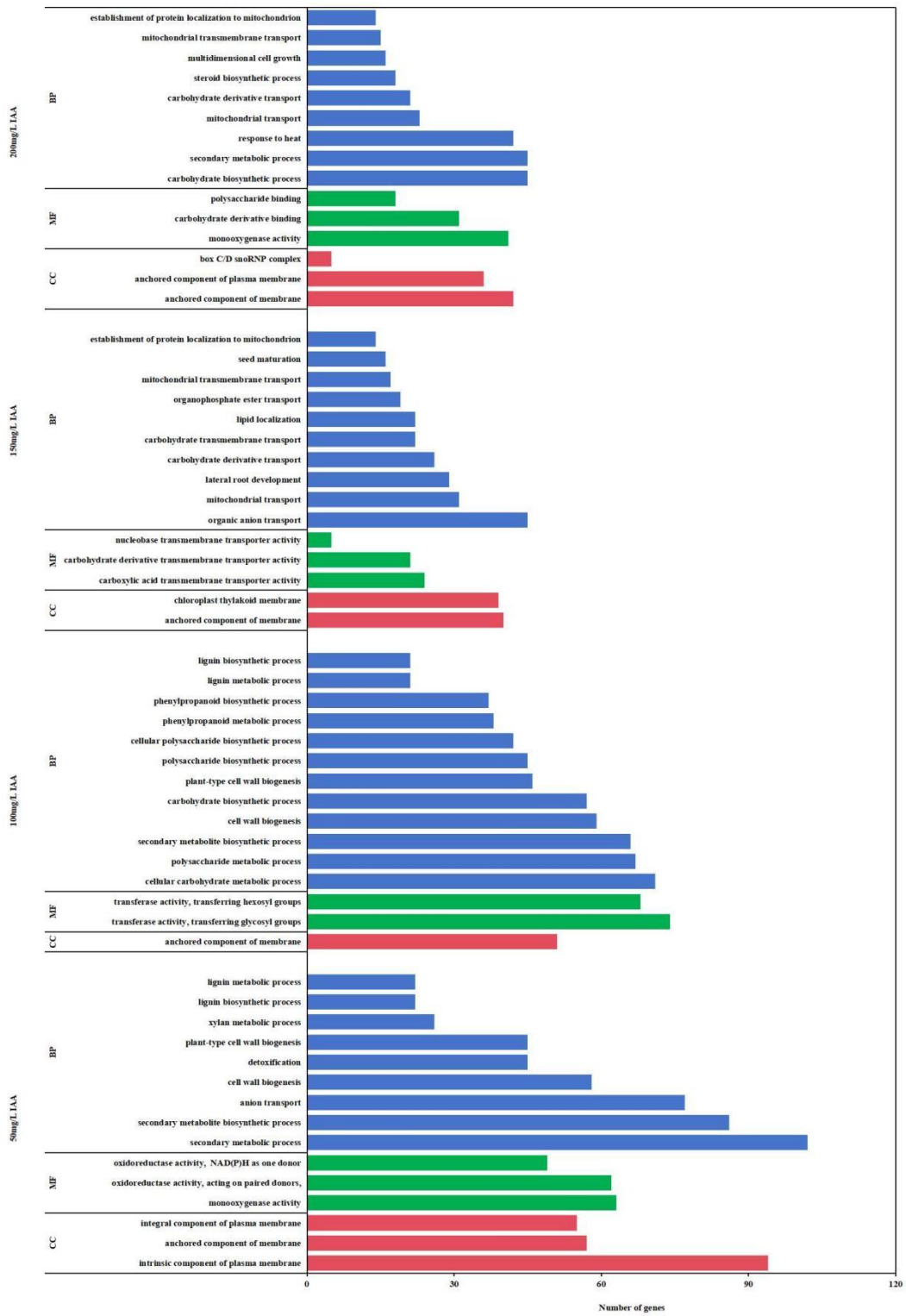
Fig. 4 Plot of number of differentially expressed genes and Venn of differentially expressed genes between different IAA treatments

2.6 差异基因富集分析

2.6.1 差异表达基因 GO 富集分析

对差异基因进行 GO 富集分析，如图 5 所示，每个 IAA 处理主要展示显著富集的 15 个

条目, 通过对比发现, 4 种处理后细胞组分 CC 均富集在膜的锚定成分。随着 IAA 浓度的增加, 生物过程 BP 富集条目发生了显著变化, 50 mg·L⁻¹ IAA 和 100 mg·L⁻¹ IAA 处理共同包含 5 个功能组分, 分别是次生代谢产物生物合成过程、细胞壁生物生成、植物型细胞壁生物生成、木质素代谢和木质素生物合成过程; 150 mg·L⁻¹ IAA 处理包含有机阴离子转运、线粒体转运、侧根发育、碳水化合物衍生物转运、碳水化合物跨膜转运、脂质定位、有机磷酸酯转运、线粒体跨膜运输、种子成熟和线粒体蛋白质定位的建立; 200 mg·L⁻¹ IAA 处理包含碳水化合物生物合成过程、次生代谢过程、对光的反应、线粒体运输、碳水化合物衍生物运输、类固醇生物合成过程、细胞生长、线粒体跨膜转运和线粒体蛋白质定位的建立。50 mg·L⁻¹ IAA 处理后分子功能富集在单氧化酶活性和氧化还原酶活性, 100 mg·L⁻¹ IAA 处理包含转移糖基和转移己糖基功能, 150 mg·L⁻¹ IAA 处理包含羧酸跨膜转运体活性、碳水化合物衍生物跨膜转运体活性、核碱基跨膜转运体活性功能中, 200 mg·L⁻¹ IAA 处理后包含单氧化酶活性, 碳水化合物衍生物结合和多糖结合功能组分。



BP. 生物过程; CC. 细胞组分; MF. 分子功能。

BP. Biological process; CC. cellular component; MF. Molecular function.

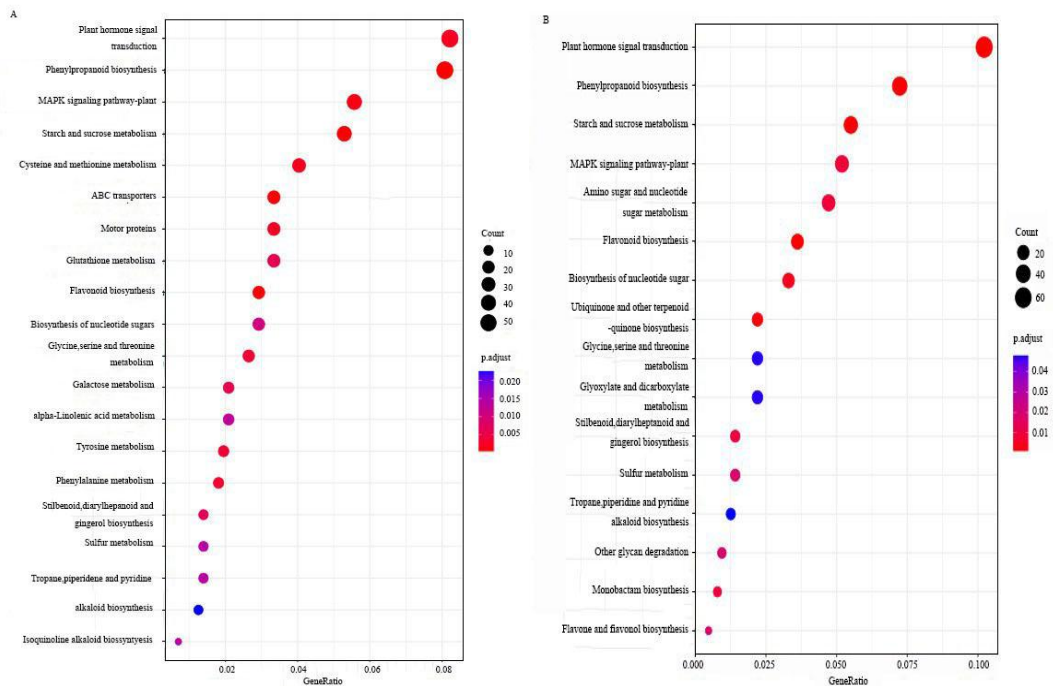
图 5 差异表达基因 GO 富集图

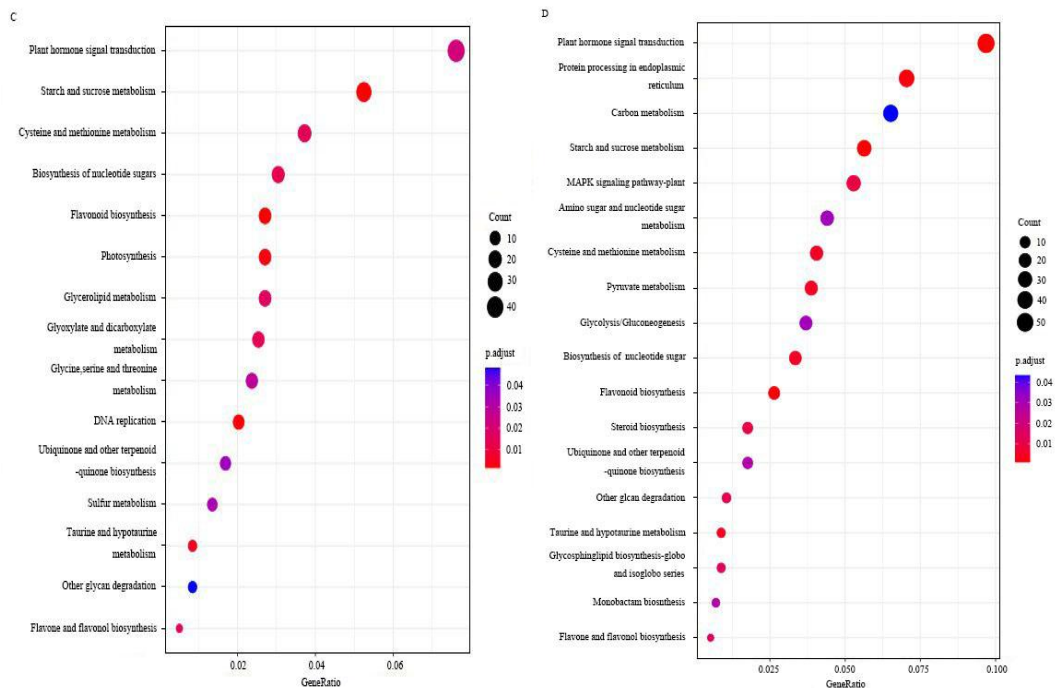
Fig. 5 GO enrichment of differentially expressed genes

2.6.2 KEGG 富集分析

如图 6 所示, 不同浓度生长素 IAA 处理后, 核桃内果皮发育过程代谢途径发生了变化, 随着浓度的升高, $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA 处理后, 差异基因较多富集在植物激素信号转导、苯丙烷生物合成、MAPK 信号通路—植物、淀粉和蔗糖代谢、ABC 转运体、半胱氨酸和蛋氨酸代谢等其他代谢途径; $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA 处理后富集在植物激素信号转导、苯丙烷生物合成、淀粉和蔗糖代谢、MAPK 信号通路—植物和氨基酸糖和核苷酸糖代谢核苷酸糖的生物合成、黄酮类化合物的生物合成等其他代谢途径; $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA 处理后富集在植物激素信号转导、淀粉和蔗糖的代谢、半胱氨酸和蛋氨酸的代谢、核苷酸糖的生物合成、类黄酮的生物合成和光合作用等其他途径中; $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA 处理后富集在植物激素信号转导、内质网中的蛋白质加工、碳代谢、淀粉和蔗糖代谢、MAPK 信号通路—植物和糖代谢等多个代谢途径中。

综上所述, 植物激素信号转导途径是共同代谢通路, 随着浓度的增加, 苯丙烷生物合成途径发生了显著改变, $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA 和 $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA 处理中未富集, 说明苯丙烷生物合成途径也是主要代谢通路。





A. 50 mg·L⁻¹ IAA 处理; B. 100 mg·L⁻¹ IAA 处理; C. 150 mg·L⁻¹ IAA 处理; D. 200 mg·L⁻¹ IAA 处理。

A. 50 mg·L⁻¹ IAA handle; B. 100 mg·L⁻¹ IAA handle; C. 150 mg·L⁻¹ IAA handle; D. 200 mg·L⁻¹ IAA handle.

图 6 差异基因 KEGG 富集分析

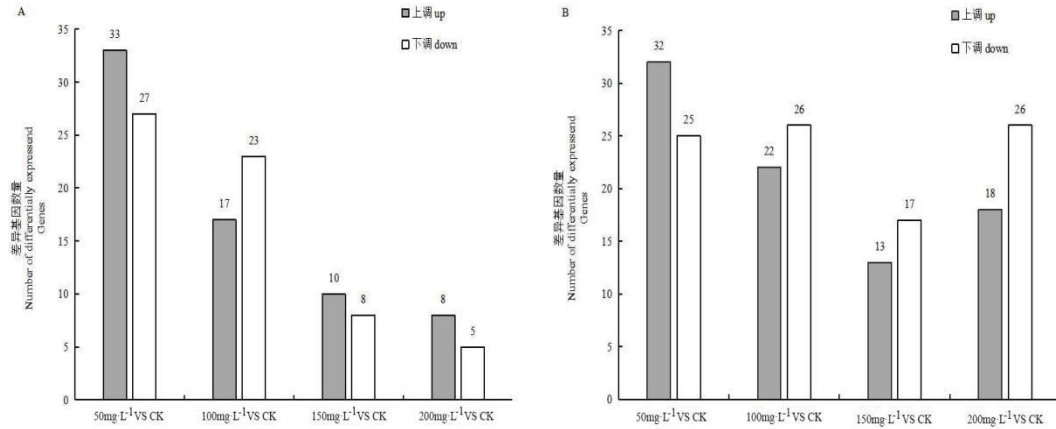
Fig. 6 Differential gene KEGG enrichment analysis

2.7 外源激素调控苯丙烷生物合成与植物激素信号转导相关基因筛选

根据前期的实验结果初步推测核桃内果皮经外源施加生长素后在植物激素信号转导和苯丙烷生物合成表达上存在明显的差异, 因此对上述两条途径的相关基因进行统计分析。以 \log_2FC 的绝对值 ≥ 1 且 q 值 < 0.05 作为标准, 如图 7-A 所示, 50 mg·L⁻¹ IAA 处理后, 有 60 个差异表达基因参与苯丙烷生物合成途径, 48 个差异基因参与植物激素信号转导 (图 7-B); 在参与苯丙烷生物合成途径的主要酶类基因 (23 个) 中, 有 2 个 4-香豆素-CoA 连接酶基因 (*4CL*)、2 个咖啡酸 3-O-甲基转移酶 (*COMT*) 基因和 6 个苯丙氨酸解氨酶 (*PAL*) 基因在不同浓度 IAA 处理下均上调, 且随着浓度的升高, 基因表达逐渐下调, 其中 *COMT* (*LOC108984894*) 基因仅在 50 mg·L⁻¹ IAA 处理后显著上调表达, 高浓度处理下不表达 (图 8-A)。4-单加氧酶样反式肉桂酸酯 (*LOC108996947*) 基因仅在 50 mg·L⁻¹ IAA 处理中下调表达, 另一个 *C4H* 基因在低浓度中不表达, 高浓度中上调表达。所有参与苯丙烷代谢途径的差异基因中, 有 4 个过氧化物酶基因 (*LOC109007078*、*LOC109013790*、*LOC109011944* 和 *LOC108981442*) 和 1 个咖啡酸 3-O-甲基转移酶基因 (*LOC109019627*) 在 4 种处理中均表达 (图 8-B)。

在生长素信号通路中, 施加 IAA 后, 2 个生长素转运蛋白 (*PIN*)、生长素诱导蛋白 (*AUX*)、生长素反应因子 (*IAA*) 和 1 个 *SAUR* 上调, 2 个 *PIN*, 4 个 *AUX*、12 个 *IAA* 和 5 个 *SAUR* 基因下调 (图 8-E)。ABA 信号通路中, 5 个蛋白磷酸酶基因 (*PP2C-24*、*PP2C-75*、*PP2C-37*、

PP2C-51 和 *PP2C-56*) 在 4 种浓度处理中均上调表达; 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 *BSK7* 基因在 50 mg·L⁻¹ IAA 处理、100 mg·L⁻¹ IAA 处理和 150 mg·L⁻¹ IAA 处理中均上调表达, 200 mg·L⁻¹ IAA 处理中不表达, 另一个基因 *LOC109011144* 仅在 50 mg·L⁻¹ IAA 处理中上调 (图 8-D)。赤霉素受体 *GID1B* 在 4 个处理中均下调表达, 3 个蛋白质 TIFY、1 个 MYC 转录因子、9 个与水杨酸 PR 蛋白和 1 个乙烯反应因子 ERF 仅在 50 mg·L⁻¹ IAA 处理中表达 (图 8-F)。

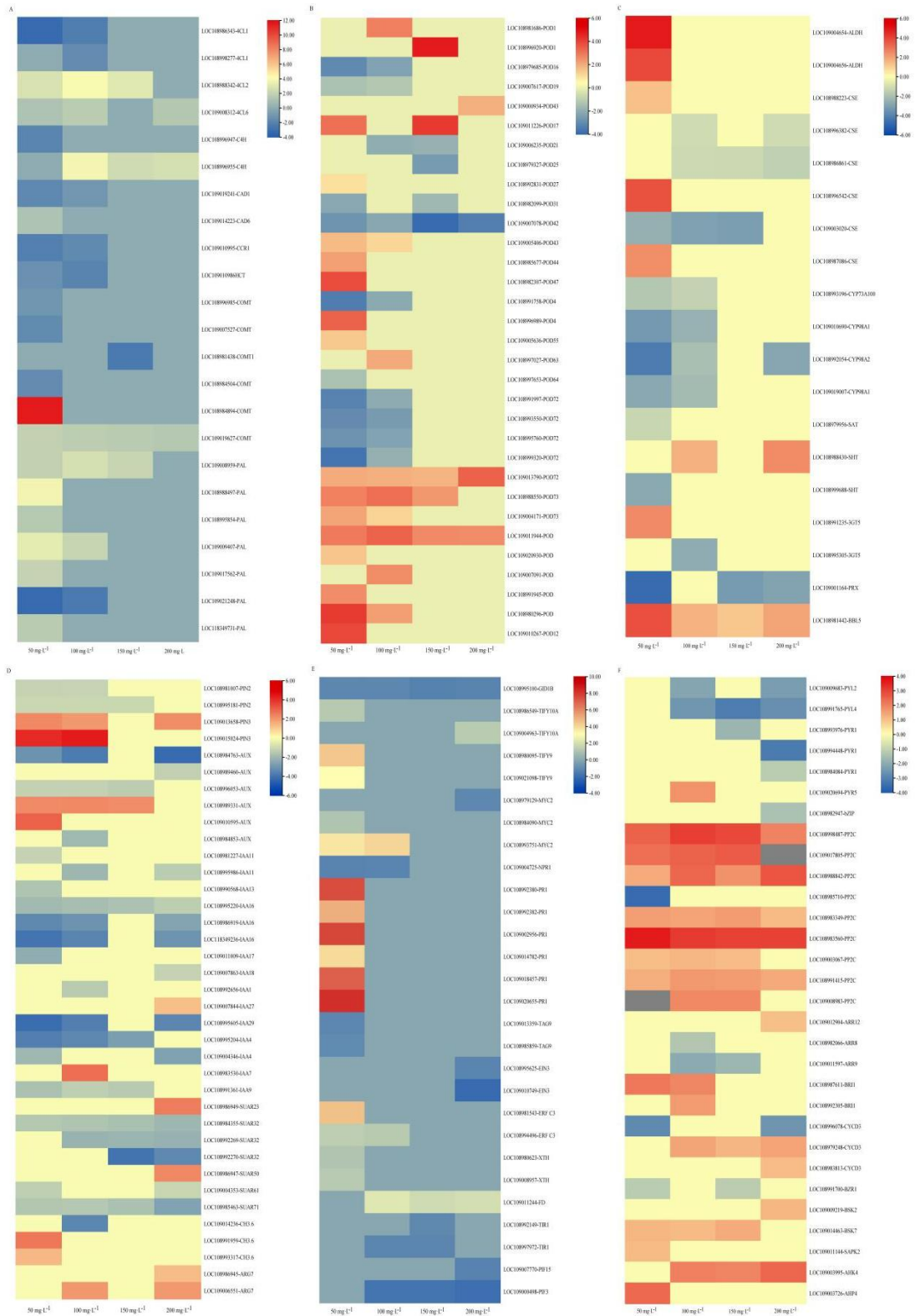


A. 木质素合成相关的差异表达基因; B. 植物激素信号传导相关的差异表达基因。

A. Differentially expressed genes related to lignin synthesis; B. Differentially expressed genes related to plant hormone signaling.

图 7 可能与外源 IAA 响应相关的差异表达基因

Fig. 7 Differentially expressed genes that may be associated with exogenous IAA response



A. 参与木质素合成主要酶类基因; B. 过氧化物酶类基因; C. 类黄酮途径细胞色素 P450 类基因; D. 生长素类基因; E. 赤霉素、茉莉酸、水杨酸、乙烯类基因; F. 脱落酸、油菜素甾体、细胞分裂素类基因。
A. Genes involved in major enzymes of lignin synthesis; B. Peroxidase genes ; C. Flavonoids pathway cytochrome P450 class genes ; D. Auxin genes; E. Gibberellin genes, Jasmonic acid genes, Salicylic acid genes, Ethylene genes; F. Abscisic acid genes, Brassinosteroid genes, Cytokinin genes.

图 8 不同浓度 IAA 处理下与苯丙烷代谢途径和植物激素信号转导相关差异基因的 log₂ 倍变化值热图

Fig. 8 Heat map of log₂-fold change values of differential genes related to Phenylpropanoid biosynthesis and Plant hormone signal transduction under different concentrations of IAA treatment

3 讨论

生长素是一种在低浓度时促进植物生长发育的有机物质,调节植物的许多发育过程,包括细胞的扩张、根的起始、维管组织的分化、芽和花的生长;生长素也是控制根生长、根向地性和维管分化的主要植物激素^[24]。核桃内果皮在坚果的生长发育、加工、运输及贮藏中起着重要的作用。郑志锋等^[25]对核桃内果皮的化学成分检测结果表明,在核桃的内果皮中存在大量的木质素,同时说明木质素是构成核桃内果皮的重要成分;李夕勃等^[26]根据对各个核桃品种的硬壳构造及硬壳中木质素浓度的检测数据分析发现,木质素浓度越高,核桃坚果的缝合线越严密、硬壳越硬、硬壳就越厚,笔者在本研究中通过间苯三酚染液对核桃切片进行染色后发现,前期,与对照相比经低浓度 IAA 处理后内果皮着色部位及颜色均增加,在靠近缝合线的地方开始出现粉红色,且程度不同,说明内果皮中木质素开始沉积;处理后 24 d,可观察到在内果皮与中果皮交接位置出现淡黄色果壳,但木质素尚未出现大量沉积,仅在坚果顶部和底端沉积,而高浓度 IAA 处理后效果并不明显,相比之下,染色部位较少。生长素可以刺激木质部组织分化,外源 IAA 诱导形成层分裂,从而促进木质部组织分化。在辣椒和茄属植物中,生长素促进了次生木质部的生长,而生长素抑制剂则完全或部分表现出相反的特征。笔者在本研究中通过测定内果皮中木质素的含量,所得结果与间苯三酚染色结果基本一致。不同的激素处理对木质素的含量有不同的影响,先前的研究表明,低浓度 IAA 处理会增加木质素的含量。木质素沉积主要存在于增厚细胞壁,是植物细胞壁的重要组成部分,它的主要功能是提供机械支持和水的运输^[27]。高沉积量阻碍了胡萝卜主根的味道、质地和质量,而木质素含量的下降可能会影响植物的生长和发育^[28],IBA 处理降低了胡萝卜的木质素含量。当用 NAA 处理大豆下胚轴时,也观察到了类似的结果,此外,经 IBA 处理的肉桂扦插植株的木质素含量有所下降。核桃内果皮生长发育过程中,纤维素也是构成次生壁的因子之一,在马尾松木质部组织中显著上调表达,外源 IAA 可显著增加纤维素含量和木质素含量^[29]。在本研究中,内果皮中纤维素含量整体呈上升趋势,与对照相比,不同浓度的 IAA 处理后,前期纤维素含量均高于对照;24 d 时,50 mg·L⁻¹ IAA 处理纤维素含量最高。且笔者课题组通过前期研究发现,薄壳品种温 185 和新新 2 核桃在经不同浓度 IAA 处理后,核桃果壳厚度和硬壳机械强度均增加,其中 50 mg·L⁻¹ IAA 处理效果最佳^[30]。经高浓度的 IAA 处理后核桃内果皮木质素含量增加趋势减缓,且根据转录组数据分析发现,低浓度 IAA 处理后,筛选出的与木质素途径相关的差异基因较高浓度的差异基因多,推测 IAA 处理对木质素的含量有一定的影响,但是 IAA 在核桃内果皮中木质素相关基因表达和木质

素积累中的机制尚不清楚。

生长素对植物次生生长期有重要的影响，且与植物生长发育过程密切相关^[31]，外源施加 IAA，短时间内显著影响高粱内源激素的含量。低浓度 IAA 处理促进杉木苗高生长，高浓度 IAA 抑制苗高生长^[32]；喷施低浓度 IAA 对叶用莴苣植株内源 IAA 含量显著增加，高浓度 IAA 处理后，作用并不明显，但促进 IAA 含量达到峰值^[33]。笔者在本研究中发现不同浓度 IAA 处理后 12 d 时，50 mg·L⁻¹ IAA 和 100 mg·L⁻¹ IAA 处理后，核桃内果皮中内源 IAA 含量显著增加，150 mg·L⁻¹ IAA 处理后与对照相比无明显作用，但是 200 mg·L⁻¹ IAA 处理后，内源 IAA 含量比对照低，推测可能是通过影响其他的内源激素含量来调控核桃内果皮的生长发育。处理 36 d 开始，不同浓度 IAA 处理核桃内果皮中内源 IAA 含量均呈上升趋势，推测外源 IAA 影响内源 IAA 含量的变化，进而影响内果皮的发育。

通过前期的研究可知 *PAL*、*C4H*、*4CL*、*CAD* 是木质素合成过程中的关键酶基因，笔者在本研究中找到 74 个差异显著基因，大部分基因编码参与苯丙烷生物合成途径的主要几个酶，从 log₂ 倍变化值热图可看出 *4CL*、*COMT* 和 *PAL* 基因在不同浓度 IAA 处理下均上调，且随着浓度的升高，基因的表达量呈下降趋势；在这些主要的酶基因中有 4 个 *COMT* (*LOC108996985*、*LOC109007527*、*LOC108984504*、*LOC108984894*) 基因、4 个 *PAL* (*LOC108988497*、*LOC108995854*、*LOC109017562*、*LOC118349731*) 基因、1 个 *C4H* (*LOC108996947*) 基因和 1 个 *CAD* (*LOC109014223*) 基因仅在 50 mg·L⁻¹ IAA 处理后显著表达，高浓度处理下不表达，其中 *COMT* (*LOC108984894*) 基因在 50 mg·L⁻¹ IAA 处理后极显著高表达；推测这些在低浓度 IAA 处理后表达，在高浓度 IAA 处理后低表达或不表达的基因，可能就是调控木质素合成的主要基因。在所有参与该途径的差异基因中，有 4 个 *POD* 基因和 *COMT* 基因在 4 种处理中均参与调节。在对临沧云烟以及菜豆豆荚等试验中发现赤霉素和生长素等激素，能够提高木质素合成关键酶 *POD* 和 *PAL* 活性从而促进木质素合成，休眠期喷洒 IAA 使花芽中 *PAL* 活性增加^[34]。通过抑制 *C4H* 的表达，降低橄榄^[35]、毛竹^[36] 等植物中 S 型与 G 型木质素单体比例，从而影响木质素含量。不同浓度烯效唑和赤霉素处理通过调控 *EjCAD5* 的表达延缓枇杷采后冷害木质化，导致木质素含量减少^[37]。

植物生长调节剂可调控植物细胞和细胞壁的生长过程，影响植物的形态建成。许多植物基因组中的转录因子，均参与多种生长发育过程，包括次生细胞壁的形成，生物和非生物胁迫反应等^[38]。研究表明，生长素响应蛋白基因 (*IAA*、*ARF* 和 *SAUR*)、生长素反应蛋白基因 (*AUX1*)、生长素反应阻遏子 (*AUX/IAA*) 是 IAA 信号转导途径的关键基因^[39]。笔者在本研究中通过分析转录组数据发现与生长素相关的 19 个基因，被注释在 Auxin transporter-like protein, auxin-induced protein, auxin-responsive protein, auxin-responsive protein SAUR 等，低浓度 IAA 处理后，与生长素相关的大部分基因下调表达，随着浓度的升高，部分基因表达量降低或不表达。在拟南芥中，生长素通过 “*AtARF8.4-AtMYB26*” 途径调控内植物的木质化^[40]。*AtARF17* 通过在花药开裂过程中直接激活 *AtMYB108* 来调控内皮质的

木质化^[41]。在杨树中，“*PtoARF5-PtoHB7/8*”信号级联介导了早期木材发育过程中生长素触发的木质部细胞分化^[42]；而 *AtARF2* 的同源物 *PtrARF2.1* 则影响木质素的生物合成^[43]。在水稻中，*OsARF6/17* 通过调节叶片关节中次生细胞壁的生物合成来控制旗叶角^[44]。

综上所述，笔者在本研究中明确了外源施用 IAA 对核桃内果皮木质素积累的变化，并引起木质素、纤维素、半纤维素含量和内源激素含量的变化，促进内果皮的发育。在转录水平上，低浓度 IAA 处理下，诱导相关基因进行物质交流和信号转导途径，使得积累大量木质素，并引起 MYC、PIF 等转录因子的变化。外源施用 IAA 后，主要引起了植物激素信号途径和木质素合成途径的变化，诱导了相关基因的表达，但具体影响机制还有待于进一步研究。

4 结论

通过对新露核桃进行不同浓度生长素 IAA 处理，与对照相比，发现 50 mg·L⁻¹ IAA 和 100 mg·L⁻¹ IAA 对核桃内果皮木质素的积累起显著促进作用，150 mg·L⁻¹ IAA 和 200 mg·L⁻¹ IAA 抑制木质素的合成，主要表现在木质素沉积、木质素、纤维素和内源 IAA 含量等方面，表明外源 IAA 对核桃内果皮的发育不完整有一定的作用。通过转录组测序，差异基因主要富集在苯丙烷生物合成途径和植物激素信号转导途径，且随着浓度的增加，与木质素合成和生长素相关的部分差异基因表达量降低或不表达。

参考文献 References:

- [1] MEENTS M J, WATANABE Y, SAMUELS A L. The cell biology of secondary cell wall biosynthesis[J]. *Annals of Botany*, 2018, 121(6): 1107-1125.
- [2] DIDI V, JACKSON P, HEJÁTKO J. Hormonal regulation of secondary cell wall formation[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(16): 5015-5027.
- [3] LE GALL H, PHILIPPE F, DOMON J M, GILLET F, PELLOUX J, RAYON C. Cell wall metabolism in response to abiotic stress[J]. *Plants*, 2015, 4(1): 112-166.
- [4] ZHAO Q, DIXON R A. Transcriptional networks for lignin biosynthesis: more complex than we thought?[J]. *Trends in Plant Science*, 2011, 16(4): 227-233.
- [5] PARK E J, KIM H T, CHOI Y I, LEE C H, NGUYEN V P, JEON H W, CHO J S, FUNADA R, PHARIS R P, KUREPIN L V, KO J H. Overexpression of gibberellin 20-oxidase1 from *Pinus densiflora* results in enhanced wood formation with gelatinous fiber development in a transgenic hybrid poplar[J]. *Tree Physiology*, 2015, 35(11): 1264-1277.
- [6] CECCHETTI V, ALTAMURA M M, FALASCA G, COSTANTINO P, CARDARELLI M. Auxin regulates *Arabidopsis* anther dehiscence, pollen maturation, and filament elongation[J]. *The Plant Cell*, 2008, 20(7): 1760-1774.
- [7] WANG Y, LI Y, HE S P, XU S W, LI L, ZHENG Y, LI X B. The transcription factor ERF108 interacts with AUXIN RESPONSE FACTORS to mediate cotton fiber secondary cell wall biosynthesis[J]. *The Plant Cell*, 2023, 35(11): 4133-4154.

- [8] ZHAO W Q, DING L, LIU J Y, ZHANG X, LI S, ZHAO K K, GUAN Y X, SONG A P, WANG H B, CHEN S M, JIANG J F, CHEN F D. Regulation of lignin biosynthesis by an atypical bHLH protein CmHLB in *Chrysanthemum*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2022, 73(8): 2403-2419.
- [9] ZHAO X W, WANG Q, WANG D, GUO W, HU M X, LIU Y L, ZHOU G K, CHAI G H, ZHAO S T, LU M Z. PagERF81 regulates lignin biosynthesis and xylem cell differentiation in poplar[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2023, 65(5): 1134-1146.
- [10] TUOMINEN H, PUECH L, FINK S, SUNDBERG B. A radial concentration gradient of indole-3-acetic acid is related to secondary xylem development in hybrid aspen[J]. *Plant Physiology*, 1997, 115(2): 577-585.
- [11] SWARUP R, BENNETT M. Auxin transport: the fountain of life in plants?[J]. *Developmental Cell*, 2003, 5(6): 824-826.
- [12] SCHRADER J, BABA K, MAY S T, PALME K, BENNETT M, BHALERAO R P, SANDBERG G. Polar auxin transport in the wood-forming tissues of hybrid aspen is under simultaneous control of developmental and environmental signals[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(17): 10096-10101.
- [13] LEYSER O. Auxin distribution and plant pattern formation: how many angels can dance on the point of PIN?[J]. *Cell*, 2005, 121(6): 819-822.
- [14] 蒋旭, 崔会婷, 王珍, 张铁军, 龙瑞才, 杨青川, 康俊梅. 紫花苜蓿 MsNST 的克隆及对木质素与纤维素合成的功能分析[J]. *中国农业科学*, 2020, 53(18): 3818-3832.
- JIANG Xu, CUI Huiting, WANG Zhen, ZHANG Tiejun, LONG Ruicai, YANG Qingchuan, KANG Junmei. Cloning and function analysis of MsNST in lignin and cellulose biosynthesis pathway from alfalfa[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2020, 53(18): 3818-3832.
- [15] 刘佳欣, 刘慧子, 石晶静, 于颖, 王超. 白桦 MYB 基因响应激素及盐旱处理的表达研究[J]. *植物研究*, 2020, 40(5): 743-750.
- LIU Jiaxin, LIU Huizi, SHI Jingjing, YU Ying, WANG Chao. Expression of MYB genes of birch in response to hormones, salt and drought[J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2020, 40(5): 743-750.
- [16] 马海霞. 茉莉酸对橡胶草乳管分化调控机制的研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2017.
- MA Haixia. Study on the regulation of jasmonic acid on the laticifer differentiation of *Taraxacum kok-saghyz* Rodin[D]. Shihezi: Shihezi University, 2017.
- [17] 高娅北, 孙曙光, 王胜雷, 陈二龙, 杨晓亮, 孙占伟, 宋朝鹏. 烤烟成熟期烟叶木质素合成关键酶基因的转录分析[J]. *中国烟草学报*, 2019, 25(3): 43-51.
- GAO Yabei, SUN Shuguang, WANG Shenglei, CHEN Erlong, YANG Xiaoliang, SUN Zhanwei, SONG Chaopeng. Transcriptional analysis of key enzyme genes in synthesis of lignin in flue-cured tobacco leaves during maturity stage[J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2019, 25(3): 43-51.
- [18] 何海丽. 外源物质对临沧云烟 87 烟叶折断率的影响及机制研究[D]. 昆明: 云南大学, 2017.
- HE Haili. Effect of exogenous substance on the mechanical strength of *Nicotiana tabacum* cv. Yunyan 87 leaves in Lincang the proposed and mechanism[D]. Kunming: Yunnan University, 2017.
- [19] 谢国芳, 刘娜, 宋易, 管春花, 张明生. 菜豆豆荚发育过程中内源激素与细胞壁代谢的关系[J]. *园艺学报*, 2021, 48(2): 289-299.
- XIE Guofang, LIU Na, SONG Yi, GUAN Chunhua, ZHANG Mingsheng. The relationship between changes of endogenous hormones and cell wall metabolism of common bean during bean development[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2021, 48(2): 289-299.

[20]梁任繁, 苏义成, 仇惠君, 符志新. 叶面喷施多效唑对网纹甜瓜幼苗农艺性状、内源激素的影响及其相互关系[J]. 中国瓜菜, 2023, 36(6): 50-57.

LIANG Renfan, SU Yicheng, QIU Huijun, FU Zhixin. Effects of spraying paclobutrazol (PP333) on agronomic characters of muskmelon seedlings and endogenous hormones, and their relationship[J]. China Guacai, 2023, 36(6): 50-57.

[21] 鱼尚奇, 张锐, 郭众仲, 宋岩, 付嘉智, 武鹏雨, 马治浩. 核桃内果皮硬化期生长素动态变化及差异表达基因分析[J]. 园艺学报, 2021, 48(3): 487-504.

YU Shangqi, ZHANG Rui, GUO Zhongzhong, SONG Yan, FU Jiazhi, WU Pengyu, MA Zhihao. Dynamic changes of auxin and analysis of differentially expressed genes in walnut endocarp during hardening[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2021, 48(3): 487-504.

[22] 赵玉雪, 朱佳敏, 杨霞, 娄丽. 核桃青皮中木质素、纤维素、半纤维素测定初报[J]. 贵州林业科技, 2021, 49(2): 7-10.

ZHAO Yuxue, ZHU Jiamin, YANG Xia, LOU Li. A preliminary report on the determination of lignin, cellulose and hemicellulose in walnut green husk[J]. Guizhou Forestry Science and Technology, 2021, 49(2): 7-10.

[23] 燕雪蒙. 胡杨等三种杨树生根期间内源激素及酶活性变化分析[D]. 西宁: 青海大学, 2013.

YAN Xueming. Studies on endogenous hormone levels and enzyme activity in cuttings of *Populus euphratica* Oliv three poplar species during rooting process[D]. Xining: Qinghai University, 2013.

[24] ALONI R, ALONI E, LANGHANS M, ULLRICH C I. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism[J]. Annals of Botany, 2006, 97(5): 883-893.

[25] 郑志锋, 邹局春, 陈浪, 张宏健, 凌敏. 核桃壳木质素的 ¹H-NMR 分析[J]. 西北林学院学报, 2007, 22(2): 131-133.

ZHENG Zhifeng, ZOU Juchun, CHEN Lang, ZHANG Hongjian, LING Min. Analysis of walnut shell lignin by ¹H-NMR by ¹H-NMR[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2007, 22(2): 131-133.

[26] 李夕勃, 赵书岗, 王红霞, 高仪, 张志华. 核桃坚果硬壳结构与木质素和纤维素相关性研究[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(22): 5076-5079.

LI Xibo, ZHAO Shugang, WANG Hongxia, GAO Yi, ZHANG Zhihua. Relationship between walnut shell structures and the content of lignin and cellulose[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2012, 51(22): 5076-5079.

[27] NAKASHIMA K, TAKASAKI H, MIZOI J, SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. NAC transcription factors in plant abiotic stress responses[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2012, 1819(2): 97-103.

[28] KHAN S, STONE J M. *Arabidopsis thaliana* GH3.9 influences primary root growth[J]. Planta, 2007, 226(1): 21-34.

[29] 周紫晶, 范付华, 尚先文, 覃慧娟, 王聪慧, 丁贵杰, 谭健晖. 外源 IAA 对马尾松幼苗茎干次生生长的影响[J]. 林业科学, 2021, 57(9): 42-51.

ZHOU Zijing, FAN Fuhua, SHANG Xianwen, QIN Huijuan, WANG Conghui, DING Guijie, TAN Jianhui. Effects of exogenous IAA on stem secondary growth of *Pinus massoniana* seedlings[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2021, 57(9): 42-51.

[30] 鹿宏丽. 外源激素 IAA 和 GA3 处理对核桃内果皮硬化的影响[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2022.

LU Hongli. Effects of exogenous hormone IAA and GA3 treatments on endocarp hardening of walnut[D]. Alar: Tarim University, 2022.

[31] ZHENG L W, GAO C, ZHAO C D, ZHANG L Z, HAN M Y, AN N, REN X L. Effects of

brassinosteroid associated with auxin and gibberellin on apple tree growth and gene expression patterns[J]. Horticultural Plant Journal, 2019, 5(3): 93-108.

[32] 孙麟钧, 黄丽娜, 江宇, 李明, 吴鹏飞, 马祥庆. 外源激素对杉木苗木生长及侧枝发育的影响[J]. 森林与环境学报, 2023, 43(3): 240-249.

SUN Linjun, HUANG Lina, JIANG Yu, LI Ming, WU Pengfei, MA Xiangqing. Effects of exogenous hormones spraying on growth and lateral branch development of Chinese fir[J]. Journal of Forest and Environment, 2023, 43(3): 240-249.

[33] 杨浠艺, 李宗煦, 姜春昱, 张亿军, 王昱卜, 韩莹琰, 刘超杰, 郝敬虹. 外源生长素对叶用莴苣抽薹过程中内源激素含量的影响[J]. 北京农学院学报, 2023, 38(4): 40-44.

YANG Xiyi, LI Zongxu, JIANG Chunyu, ZHANG Yijun, WANG Yubo, HAN Yingyan, LIU Chaojie, HAO Jinghong. Effects of exogenous auxin on endogenous hormone content and flower-related gene expression during leaf lettuce bolting[J]. Journal of Beijing University of Agriculture, 2023, 38(4): 40-44.

[34] 刘超, 武云杰, 张安乾, 贺文俊, 张思琦, 陈芳, 何佳, 周方, 杨铁钊, 叶红朝. 外源 GA3 和 IAA 对烤烟内源激素调控效应和常规化学成分的影响[J]. 中国农业科技导报, 2019, 21(8): 153-160.

LIU Chao, WU Yunjie, ZHANG Anqian, HE Wenjun, ZHANG Siqi, CHEN Fang, HE Jia, ZHOU Fang, YANG Tiezhao, YE Hongchao. Effects of exogenous GA3 and IAA on growth regulation and quality of flue-cured tobacco[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2019, 21(8): 153-160.

[35] 王云梅. 橄榄叶黄酮合成相关基因 cDNA 的克隆[D]. 福州: 福建农林大学, 2009.

WANG Yunmei. Cloning of cDNA encoding for associated genes of flavone biosynthesis in Chinese white olive (*Canarium album* Raeusch. cv. Changying) leaves[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2009.

[36] 李广柱, 朱成磊, 杨克彬, 王新悦, 高志民. 毛竹 C4H 基因的鉴定及其表达模式分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2022, 30(2): 151-160.

LI Guangzhu, ZHU Chenglei, YANG Kebin, WANG Xinyue, GAO Zhimin. Identification and expression pattern analysis of C4H genes in *Phyllostachys edulis*[J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2022, 30(2): 151-160.

[37] 刘星贝. 烯效唑和赤霉素浸种对甜荞抗倒伏性能的影响及其机理研究[D]. 重庆: 西南大学, 2017.

LIU Xingbei. Effects of seed soaking with Uniconazole and Gibberellin on lodging resistance in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.) and its potential mechanism[D]. Chongqing: Southwest University, 2017.

[38] GHELLI R, BRUNETTI P, NAPOLI N, DE PAOLIS A, CECCHETTI V, TSUGE T, SERINO G, MATSUI M, MELE G, RINALDI G, PALUMBO G A, BAROZZI F, COSTANTINO P, CARDARELLI M. A newly identified flower-specific splice variant of AUXIN RESPONSE FACTOR8 regulates stamen elongation and Endothecium lignification in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2018, 30(3): 620-637.

[39] XU X F, WANG B, FENG Y F, XUE J S, QIAN X X, LIU S Q, ZHOU J, YU Y H, YANG N Y, XU P, YANG Z N. AUXIN RESPONSE FACTOR17 directly regulates MYB108 for anther dehiscence[J]. Plant Physiology, 2019, 181(2): 645-655.

[40] XU C Z, SHEN Y, HE F, FU X K, YU H, LU W X, LI Y L, LI C F, FAN D, WANG H C, LUO K M. Auxin-mediated Aux/IAA-ARF-HB signaling cascade regulates secondary xylem development in *Populus*[J]. The New Phytologist, 2019, 222(2): 752-767.

[41] FU Y Y, WIN P, ZHANG H J, LI C F, SHEN Y, HE F, LUO K M. PtrARF2.1 is involved in regulation of leaf development and lignin biosynthesis in poplar trees[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019,

20(17): 4141.

[42] HUANG G Q, HU H, VAN DE MEENE A, ZHANG J, DONG L, ZHENG S, ZHANG F L, BETTS N S, LIANG W Q, BENNETT M J, PERSSON S, ZHANG D B. AUXIN RESPONSE FACTORS 6 and 17 control the flag leaf angle in rice by regulating secondary cell wall biosynthesis of lamina joints[J]. *The Plant Cell*, 2021, 33(9): 3120-3133.

[43] SOMERVILLE C, BAUER S, BRININSTOOL G, FACETTE M, HAMANN T, MILNE J, OSBORNE E, PAREDEZ A, PERSSON S, RAAB T, VORWERK S, YOUNGS H. Toward a systems approach to understanding plant cell walls[J]. *Science*, 2004, 306(5705): 2206-2211.

[44] BONAWITZ N D, CHAPPLE C. The genetics of lignin biosynthesis : Connecting genotype to phenotype[J]. *Annual Review of Genetics*, 2010, 44: 337-363.