

槟子脂氧合酶基因 *LOX2a* 的克隆与表达分析

王庆华^{1,2}, 高佳慧², 王磊³, 吴文江⁴, 郭家选², 吴国良^{3*}, 沈元月^{2*}

(¹河南农业大学林学院, 郑州 450002; ²北京农学院农业应用新技术北京市重点实验室, 北京 102206; ³河南农业大学园艺学院, 郑州 450002; ⁴河南农业大学农学院, 郑州 450002)

摘要:【目的】脂氧合酶 LOX 是植物香气代谢脂氧合酶途径的起始酶, 探究槟子 (*Malus pumila* × *M. asiatica*) *LOX2a* 基因在果实香气合成中的作用, 为 *LOX2a* 基因在槟子果实中的功能研究奠定基础。【方法】以槟子转录组和挥发性物质检测数据为基础, 筛选并克隆槟子 *LOX2a* 基因, 利用生物信息学对其功能域、理化性质等进行预测, 通过亚细胞定位分析 *LOX2a* 在细胞水平的表达位置, 利用 RT-qPCR 检测 *LOX2a* 的时空表达水平, 结合圆片温育和外源激素处理探究激素对 *LOX2a* 基因表达的调控作用。【结果】槟子 *LOX2a* 开放阅读框为 2721 bp, 编码 906 个氨基酸, 含有一个保守的 Lipoygenase 功能域, 编码蛋白定位于细胞质; 系统发育进化分析表明槟子 *LOX2a* 与苹果 *LOX2a* 同源性最高; 槟子 *LOX2a* 在根部表达水平最高, 种子中最低; 在果实发育过程中花后 30 d 时表达水平最高, 随后降低并维持在一定水平, 到成熟 (花后 150 d) 时表达水平上升; 槟子 *LOX2a* 启动子上含有响应脱落酸、茉莉酸甲酯、赤霉素和水杨酸的顺式作用元件, 且其表达受到这 4 种激素及乙烯的诱导。【结论】槟子 *LOX2a* 基因可能通过多种激素信号通路参与槟子果实的香气代谢过程。

关键词: 槟子; *LOX2a*; 基因克隆; 表达分析; 激素诱导

中图分类号: S661.1

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2022)11-1977-12

Cloning and expression analysis of Binzi *LOX2a*

WANG Qinghua^{1, 2}, GAO Jiahui², WANG Lei³, WU Wenjiang⁴, GUO Jiaxuan², WU Guoliang^{3*}, SHEN Yuanyue^{2*}

(¹College of Forestry, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan, China; ²Beijing Key Laboratory for Agricultural Application and New Technique, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; ³College of Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan, China; ⁴College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan, China)

Abstract:【Objective】Binzi (*Malus pumila* × *M. asiatica*), an old local fruit species in Beijing, belongs to the Rosaceae family. Binzi is one of the varieties, and its fruit can give forth full aroma. Lipoygenase (LOX), catalyzing the oxygenation of unsaturated fatty acids, contributes to the formation of fruit aroma. However, the LOX has not been reported in Binzi fruit, and the molecular mechanism of aroma formation remains unknown. In the present study, we firstly cloned the *LOX2a* gene from the Binzi, and identified its expression pattern in different tissues and at different fruit developmental stages. Moreover, the effect of phytohormone on *LOX2a* gene expression level was analyzed. 【Methods】The Binzi fruits were collected on 17 May, 16 June, 17 July, 15 August and 14 September in 2020. We screened one *LOX* gene based on the results of total volatiles and transcriptome data of Binzi fruit after harvest. The *LOX2a* protein sequences of different plants with higher homology were downloaded from the NCBI database, and phylogenetic tree was constructed by MEGA 5.1 software through NJ method (Neighbor-Joining). The protein conserved domain, protein secondary and tertiary structure, molecular weight, molecular formula, isoelectric point, and subcellular localization of Binzi *LOX2a* protein were analyzed using online software. In addition, *cis*-acting elements in *LOX2a* promoter region were predicted with

收稿日期: 2022-08-17 接受日期: 2022-09-23

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (32030100); 国家自然科学基金 (32072516)

作者简介: 王庆华, 男, 在读博士研究生, 研究方向为果实发育及成熟调控。Tel: 18801118791, E-mail: qinghuasummer@163.com

*通信作者 Author for correspondence. E-mail: walnut_wu@163.com

PlantCARE software. Binzi *LOX2a* was cloned into the pCAMBIA-Super1300-GFP vector to construct the 35S::*LOX2a-GFP* recombinant vector. The recombinant vector and one control GFP vector were respectively transformed into *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 competent cells, and then were transformed into tobacco (*Nicotiana × tabacum*) leaf cells. After 3 days, the subcellular localization of *LOX2a* was observed under a Confocal laser scanning microscope. The expression characteristics of *LOX2a* in different plant tissues (root, stem, leaf, flower and seed) and fruit at different (30, 60, 90, 120 and 150 d after flowering period) development stages were detected through the Real-Time fluorescence quantitative PCR. Finally, the fruit at 90 d after flowering period was chosen for further hormone treatment research. Fruit discs (10 mm in diameter and 1 mm in thickness) were prepared with a cork borer. The discs were immediately immersed in equilibration buffer (200 mmol·L⁻¹ Mannitol, 50 mmol·L⁻¹ MES pH 5.5, 10 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 10 mmol·L⁻¹ EDTA, 5 mmol·L⁻¹ CaCl₂ and 5 mmol·L⁻¹ Vc). The discs were respectively incubated in equilibration buffer with 100 mmol·L⁻¹ ABA, 100 mmol·L⁻¹ MeJA, 100 mmol·L⁻¹ SA and 200 mmol·L⁻¹ GA₃. Meanwhile, the fruits were treated with 200 mmol·L⁻¹ ethylene and 1 mL·L⁻¹ 1-MCP. Then the expression levels of *LOX2a* gene after phytohormone treatment were determined by RT-qPCR. **【Results】**We screened out one *LOX* gene (named *LOX2a*) for further research based on the results of Binzi total volatiles and transcriptome. Binzi *LOX2a* contained 2721 bp of open reading frame and encoded 906 amino acids, which contained a conserved PLN02264 (Lipoxygenase) domain. Binzi *LOX2a* sequence has been uploaded to the NCBI database, and its GenBank No. is ON952464. The physicochemical property results of Binzi *LOX2a* showed that its protein molecular formula was C₄₆₁₂H₇₂₂₂N₁₂₅₄O₁₃₄₁S₂₇ and isoelectric point was 6.97. The protein secondary and tertiary structure prediction results showed that the *LOX2a* protein mainly contained α -helix, extended strand, and random coil with the proportion of 33.33%, 15.56% and 51.10%, respectively. The phylogenetic analysis showed that the Binzi *LOX2a* had the highest similarity with *M. domestica* *LOX2a*. The subcellular localization result showed that the green fluorescence in *Nicotiana tabacum* leaves transformed with 35S::*LOX2a-GFP* recombinant vector was only accumulated in the cytoplasm, which was consistent with the result from the Cell-PLoc 2.0 prediction. The results of RT-qPCR showed that *LOX2a* gene was expressed in roots, stems, leaves, flowers, fruits and seeds. And the expression of *LOX2a* was higher in roots, followed by the stems, leaves, and the lowest in seeds. The above results indicated the *LOX2a* gene expression had tissue expression specificity. During Binzi fruit development period, the highest expression level of *LOX2a* was detected from the 30 d after flowering period, and then increased at 150 d, which accompanied with the Binzi fruit aroma accumulation. The *cis*-acting elements of the *LOX2a* promoter consisted of the photo responsive element, hormone response element and stress related component. And the hormone response element included ABA, MeJA, GA and SA responsive element. Combining with fruit disc tissue incubation and hormone treatment, we determined the expression level of *LOX2a* using the RT-qPCR. It was found that the expression level of *LOX2a* was significantly higher after treatment with hormone than that in controls ($p < 0.05$), indicating that the *LOX2a* gene expression was induced by ABA, MeJA, GA, SA and ethylene. **【Conclusion】***LOX2a* gene may be involved in aroma metabolism of Xiangbizi fruit through multiple hormone signaling pathways.

Key words: Binzi; *LOX2a*; Gene cloning; Gene expression; Hormone induction

槟子 (*Malus pumila* × *M. asiatica*) 为蔷薇科 (Rosaceae) 苹果属 (*Malus*) 落叶乔木, 由绵苹果 (*M. pumila*) 和沙果 (*M. asiatica*) 杂交而来, 在我国有着非常悠久的栽培历史, 主要分布在北京、河北、山西、陕西等地, 是我国重要的苹果属植物种质资源^[1]。槟子品种多样、种类丰富, 不同品种之间的果色、果个和风味也略有不同^[2]。槟子, 又名酸槟子, 果形为尖顶, 果色为紫红色, 香气浓郁^[3-4]。香气赋予槟子果实独特的风味品质, 但关于其香气物质组分及合成代谢的研究还未见报道。

香气是一类具有水溶性和脂溶性特征的挥发性物质。目前, 在植物界中已经鉴定出 2000 多种挥发性物质, 主要分为酯类、醛类、醇类、萜类、酮类及酸类等^[5-6]。其中, 苹果中已发现 350 多种, 主要以酯类物质为主^[7-8]。果实中酯类物质的合成主要通过脂肪酸和氨基酸代谢途径, 其中脂肪酸代谢途径又分为脂氧合酶 (Lipoxygenase, LOX) 和 β -氧化途径^[9-11]。脂氧合酶途径主要涉及四种催化酶, 分别为脂氧合酶 (LOX)、氢过氧化物裂解酶 (HPL)、醇脱氢酶 (ADH) 和醇酰基转移酶 (AAT)^[12]。作为脂氧合酶途径的起始酶, LOX 催化亚麻酸、亚油酸等不饱和脂肪酸生成氢过氧化物, 氢过氧化物在 HPL 作用下转化成相应的醛类物质, 而这些醛类物质在 ADH 催化下生成醇, 最后由 AAT 将醇类物质催化生成短链的酯类物质, 这些酯类物质在果实香气品质形成过程中发挥重要作用^[4, 13-15]。目前, 已在多种植物中克隆到 *LOX* 基因, 如番茄^[16]、猕猴桃^[17]、梨^[18]等。南果梨中, 茉莉酸甲酯能够诱导 *PuLOX1* 和 *PuLOX3* 的表达^[19]; 辣椒 *CaLOX2* 在各个器官都有所表达, 其表达受到茉莉酸甲酯、水杨酸及 H_2O_2 的诱导, 并能够积极响应疫霉菌及低温、高盐等逆境胁迫^[20]; 过表达 *MdLOX1a* 能够提高苹果愈伤的醇类、酯类等物质含量, 表明苹果 *MdLOX1a* 有助于促进香气物质的合成^[21]。

香气是槟子果实重要的风味特征之一, 挖掘香气相关的重要基因, 对槟子呈香机制的研究具有重要意义。笔者在槟子转录组数据的基础上, 从槟子果实中克隆到脂氧合酶途径中的起始酶基因 *LOX2a*, 并通过生物信息学和分子生物学等技术手段, 对 *LOX2a* 编码蛋白质性质及表达情况进行了初步探究, 为 *LOX2a* 基因在槟子果实中的功能研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料于 2020 年 4—10 月取自北京市延庆区帮水峪村槟子种植园 (115° 56' 29.472" E, 40° 19' 42.445" N) 生长状态良好的 24 年生槟子果树。槟子果实取样时间为花后 30 d (5 月 17 日)、60 d (6 月 16 日)、90 d (7 月 16 日)、120 d (8 月 15 日) 和 150 d (9 月 14 日), 花于 4 月中旬盛花期采集, 茎、叶取自花后 150 d 结果枝新梢, 于花后 150 d 取根部材料, 种子取自花后 150 d 的果实。取样后立即运往实验室, 液氮速冻后放于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.2 总 RNA 提取及反转录

使用华越洋多糖多酚植物 RNA 提取试剂盒提取槟子各组织部位的 RNA, 具体操作参照说明书。反转录参照反转录试剂盒 TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 说明书 (北京全式金生物技术有限公司)。

1.3 CTAB 法粗提基因组

参照侯柄竹^[22]的方法提取槟子基因组, 加入 20 μ L ddH₂O 溶解基因组, 放入 -80 °C 冰箱备用。

1.4 槟子 *LOX2a* 编码区序列克隆

基于槟子转录组数据 (SRA 登录号: PRJ-NA875845), 利用 SnapGene 软件设计引物 (表 1), 以反转录得到的 cDNA 为模板, 使用高保真 DNA 聚合酶 2 × Phanta[®] Max Master Mix (南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 克隆目的片段。PCR 产物经 1% (w) 琼脂糖凝胶电泳检测后, 用 Axygen 胶回收试剂盒回收目的条带, 并连接至克隆载体 *pEASY[®]-Blunt Simple Cloning Vector* (北京全式金) 上, 转化大肠杆

表 1 PCR 引物信息

Table 1 Primers information for PCR	
引物名称	引物序列 (5'—3')
Primer name	Primer sequence (5'—3')
<i>LOX2a</i> -F	ATGGCACTGGCTAAACAAATC
<i>LOX2a</i> -R	TATCGAAATACTATTTCGGCACACC
RT-qPCR- <i>LOX2a</i> -F	TACAGTTACAAACAAGCACCAGAA
RT-qPCR- <i>LOX2a</i> -R	GATTCTTCAACTCCCCTCTGTCTCA
<i>LOX2a</i> -GFP-F	GGTCGACATTTAAATACTAGTATGGCAC-TGGCTAAACAAATC
<i>LOX2a</i> -GFP-R	GCCCTTGCTCACCATGGGTACCTATCGAA-ATACTATTCGGCACACC
Pro <i>LOX2a</i> -GST-F	CCATATGCACACCACATACAC
Pro <i>LOX2a</i> -GST-R	GATGAGTTGGTGCTTCTGCTT

菌 Trans5 α , 挑取单克隆测序(苏州金唯智生物科技有限公司)。

1.5 槟子 *LOX2a* 生物信息学分析

利用 NCBI Conserved domains (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 预测 *LOX2a* 保守结构域; 使用 TMHMM 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) 进行蛋白的跨膜结构域分析; 利用 ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线预测分子质量、等电点、蛋白质分子式、脂肪系数和不稳定系数; 利用 NPS (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html) 和 Swiss Model (<http://swiss-model.expasy.org/>) 在线分析蛋白质二级和三级结构; 利用 MEGA 5.1 软件进行氨基酸序列的同源性比对并构建系统进化树; 用 Cell-PLoc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 预测细胞定位; 通过在线软件 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 对 *LOX2a* 启动子的顺式作用元件进行分析。

1.6 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

以槟子不同组织部位和果实时期的 cDNA 为模板, 利用 Primer 5 软件设计荧光定量引物(表 1), 以苹果 *Actin* 作为内参基因, 使用 Roche LightCycler[®] 96 Real-Time PCR 仪检测 *LOX2a* 基因在槟子各个组织部位和果实时期的表达情况。荧光定量反应体系

按照全式金 *TransStart* Top Green qPCR SuperMix 说明书加样。采用三步法反应程序: 94 °C 30 s; 94 °C 5 s, 60 °C 15 s, 72 °C 10 s, 40 个循环。试验采取 3 次重复, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因的相对表达水平。

1.7 亚细胞定位

表达载体为 pCAMBIA-Super1300-GFP, 选定酶切位点 *Spe* I 和 *Kpn* I 设计引物(表 1), 克隆携有载体同源臂的目的片段, 利用同源重组酶 ClonExpress II One Step Cloning Kit(南京诺唯赞)将目的片段与表达载体相连。将构建好的重组质粒 35S::*LOX2a*-GFP 转化农杆菌 GV3101, 侵染烟草下表皮, 3 d 后在激光共聚焦下观察绿色荧光在烟草细胞的位置。

1.8 圆片温育与激素处理

选取花后 90 d 的槟子果实用于圆片温育, 使用打孔器将果实制备成直径为 1 cm 的圆柱体, 用刀片切成厚度为 1 mm 的薄片, 将果实圆片放入温育平衡液中平衡 30 min, 温育平衡液包含 50 mmol·L⁻¹ MES (pH 5.5)、10 mmol·L⁻¹ MgCl₂、10 mmol·L⁻¹ EDTA、5 mmol·L⁻¹ CaCl₂、5 mmol·L⁻¹ Vc 和 200 mmol·L⁻¹ 甘露醇。将平衡后的圆片分成 5 部分, 试验组有 4 个, 分别在平衡液中加入 100 μ mol·L⁻¹ 脱落酸 (ABA)、100 μ mol·L⁻¹ 茉莉酸甲酯 (MeJA)、100 μ mol·L⁻¹ 水杨酸 (SA) 和 200 mmol·L⁻¹ 赤霉素 (GA₃), 激素配制参照表 2。25 °C 振荡孵育, 每隔 1 h (共计 5 h) 取样 2 g, 液氮速冻, 放于 -80 °C 保存备用。

表 2 激素配制方法

Table 2 Hormone preparation method

激素 Hormone	浓度 Concentration	配制方法 Preparation method
脱落酸 ABA	100 μ mol·L ⁻¹	准确称量 ABA 粉末, 加入 1 mol·L ⁻¹ NaOH 溶液至完全溶解, 最后用 ddH ₂ O 定容。 ABA powder was accurately weighed, and added with 1 mol·L ⁻¹ NaOH solution until completely dissolved, finally diluted with ddH ₂ O.
茉莉酸甲酯 MeJA	100 μ mol·L ⁻¹	95% 茉莉酸甲酯原液 (1.03 g·mL ⁻¹) 2.29 μ L, 溶于少量乙醇, ddH ₂ O 定容至 100 mL。 2.29 μ L of 95% MeJA (1.03 g·mL ⁻¹) was dissolved in a small amount of ethanol, and then diluted to 100 mL with ddH ₂ O.
水杨酸 SA	100 μ mol·L ⁻¹	称取 SA 粉末, 溶于少量乙醇, ddH ₂ O 定容。 Dissolve SA powder in a small amount of ethanol and dilute with ddH ₂ O to constant volume.
赤霉素 GA ₃	200 mmol·L ⁻¹	称取 GA ₃ 粉末, 溶于少量乙醇, ddH ₂ O 定容。 Dissolve GA ₃ powder in a small amount of ethanol and dilute with ddH ₂ O to constant volume.
乙烯 Ethylene	200 μ mol·L ⁻¹	称取定量乙烯利粉末, 溶于 ddH ₂ O 中。 Dissolve quantitative ETH powder in ddH ₂ O.

乙烯利与 1-MCP 处理槟子果实, 具体操作过程: 将槟子浸泡在 200 μ mol·L⁻¹ 乙烯利溶液中, 20 min 后取出, 自然晾干; 将体积分数为 1 μ L·L⁻¹ 的 1-MCP 溶液与果实放入密闭中熏蒸 24 h。所有样品处理结束后放入 0.02 mm 厚 PE 保鲜袋中, 贮存条件

为温度 (20 \pm 1) °C、相对湿度 90%。

1.9 数据分析

使用软件 Excel、Origin 8.1 和 Adobe Illustrator 处理图表, 使用 SPSS Statistics v.20 进行数据的差异显著性分析 ($p < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 槟子 *LOX2a* 基因的克隆

根据笔者实验室前期获得的槟子果实转录组数据,筛选到 1 个与槟子果实采后总挥发性物质变化趋势高度相似的 LOX 家族基因(图 1)。以槟子果实 cDNA 为模板,使用特异性引物(表 1)克隆该基因,得到大小约 2700 bp 的单一一条带(图 2-A),测序结果显示该基因含有 2721 bp 的开放阅读框(open reading frame, ORF),并与苹果 *LOX2a* (GenBank:

KC706483.1)基因序列相似度最高,因此将该基因命名为槟子 *LOX2a*,已将该基因序列上传至 NCBI (GenBank: ON952464)。槟子 *LOX2a* 含有 1 个 Lipoygenase 功能域,且无跨膜结构,为膜外蛋白(图 2-B~C)。

2.2 槟子 *LOX2a* 基因的生物信息学分析

通过 ExPASy 对槟子 *LOX2a* 氨基酸序列进行分析,结果表明, *LOX2a* 编码 906 个氨基酸,分子质量为 102 559.30,等电点为 6.97,蛋白质分子式为 $C_{4612}H_{7222}N_{1254}O_{1341}S_{27}$,脂肪系数为 87.49,不稳定系数

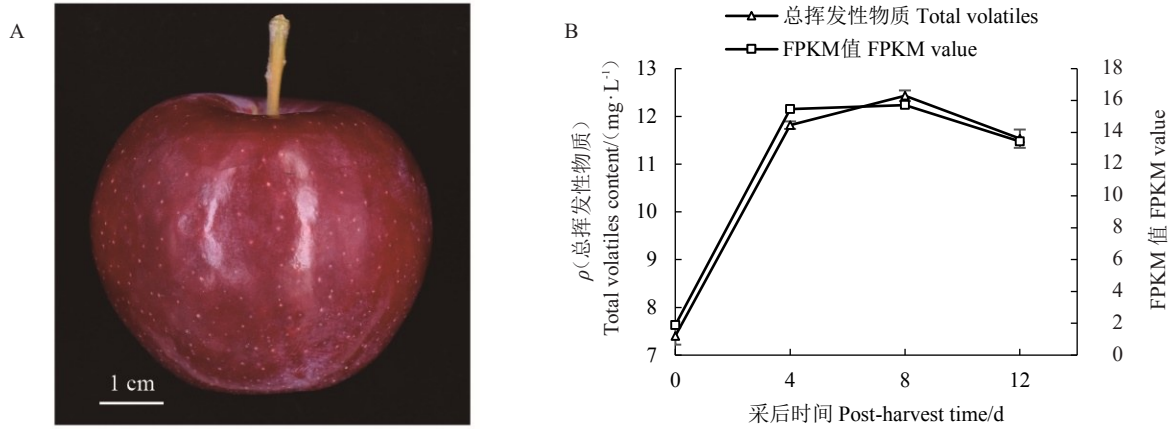
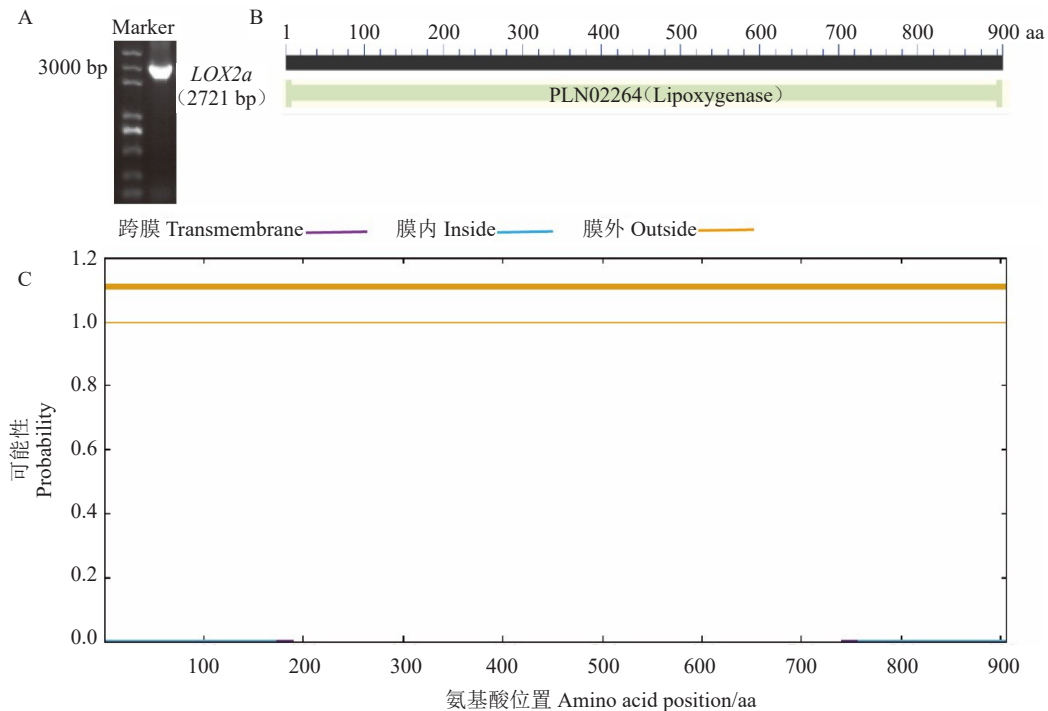


图 1 槟子果实(A)及其采后总挥发性物质含量和 *LOX2a* FPKM 值(B)的变化

Fig. 1 Variation of total volatiles contents and *LOX2a* FPKM value (B) after harvest of Binzi fruit (A)



A. 槟子 *LOX2a* 基因克隆; B. *LOX2a* 功能域分析; C. *LOX2a* 跨膜域分析。

A. Cloning of Binzi *LOX2a*; B. Functional domain of *LOX2a*; C. Transmembrane domain of *LOX2a*.

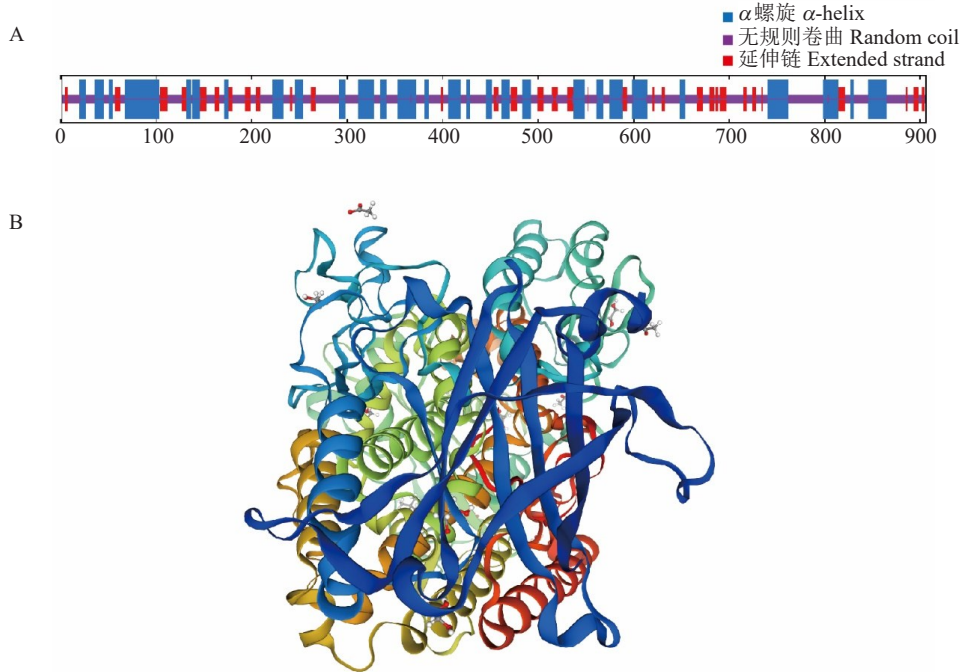
图 2 槟子 *LOX2a* 基因克隆及功能域和跨膜域分析

Fig. 2 Cloning, functional domains, and transmembrane domains of Binzi *LOX2a*

为 43.39。对 LOX2a 蛋白二级、三级结构的预测结果如图 3 所示,发现 LOX2a 蛋白的二级结构主要由 α 螺旋(α -helix)、延伸链(extended strand)和无规则卷曲(random coil)构成(图 3-A)。LOX2a 蛋白的 α 螺旋包含 302 个氨基酸,占比为 33.33%;延伸链包含 141 个氨基酸,占比为 15.56%;无规则卷曲所含氨基

酸最多,有 463 个,占比为 51.10%。

从 NCBI 下载与槟子 LOX2a 相似度较高的 21 条氨基酸序列,利用软件 MEGA 5.1 以邻接法(Neighbor-Joining method)构建 LOX2a 氨基酸序列的系统进化树。结果表明,LOX2a 的同源序列中有 11 个属于蔷薇科,其中与苹果 LOX2a 同源性最高(图 4)。



A. 槟子 LOX2a 二级结构预测; B. 槟子 LOX2a 三级结构预测。

A. Prediction of secondary structure of Binzi LOX2a; B. Prediction of tertiary structure of Binzi LOX2a.

图 3 槟子 LOX2a 二级结构和三级结构预测

Fig. 3 Prediction of secondary and tertiary structures of Binzi LOX2a

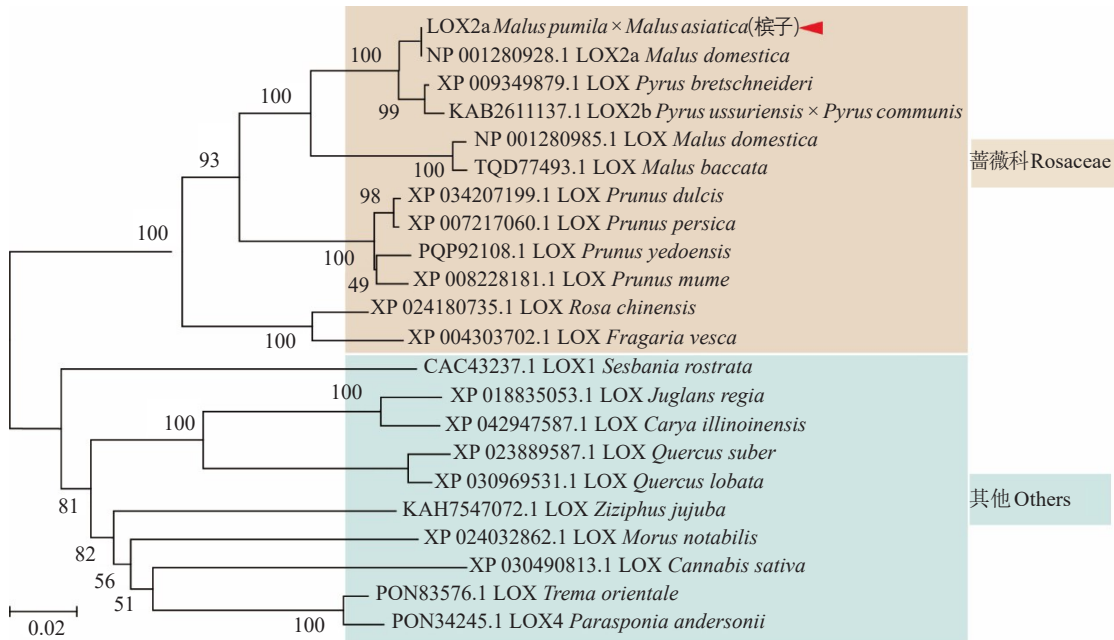


图 4 槟子 LOX2a 的系统进化分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of Binzi LOX2a

2.3 槟子 *LOX2a* 亚细胞定位

利用在线软件 Cell-PLoc 2.0 预测 *LOX2a* 定位于细胞质(Cytoplasm)。为了探究 *LOX2a* 的亚细胞定位,将携带 *35S::LOX2a GFP* 重组质粒的农杆菌 GV3101 注射到烟草下表皮。通过激光共聚焦发现

在烟草细胞质位置有绿色荧光,表明槟子 *LOX2a* 定位于细胞质(图 5)。

2.4 槟子 *LOX2a* 的时空表达

为了研究 *LOX2a* 在槟子各器官及果实发育期的表达模式,提取了根、茎、叶、花、种子和不同发育

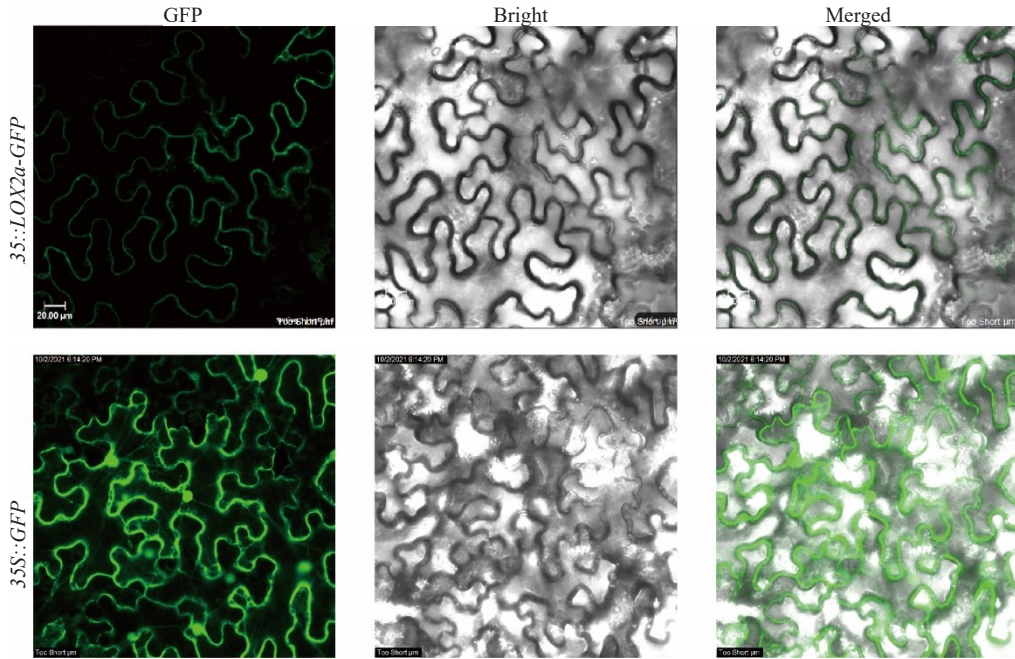


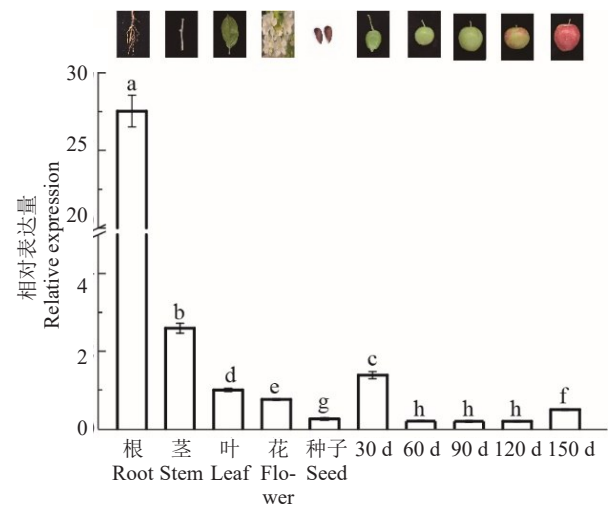
图 5 槟子 *LOX2a* 亚细胞定位

Fig. 5 Subcellular localization of Binzi *LOX2a*

期果实的总 RNA,并通过 RT-qPCR 检测了 *LOX2a* 基因的表达水平。结果表明,*LOX2a* 基因在槟子根部表达量最高,其次是茎、叶、花,表达量最低的是种子,根中表达量是种子的 109.71 倍,表明槟子 *LOX2a* 基因的表达具有组织特异性;*LOX2a* 基因在果实发育成熟过程中呈现出先降低后升高的趋势,尤其是在花后 30 d 时表达量最高,在花后 60~120 d 期间变化不明显,在成熟期(花后 150 d)时表达量呈现出升高的趋势(图 6)。

2.5 槟子 *LOX2a* 基因在激素诱导下表达分析

为了研究 *LOX2a* 基因的表达调控,对槟子 *LOX2a* 基因的启动子进行了克隆,得到长度为 1839 bp 的启动子序列(图 7)。使用在线软件 PlantCARE 对 *LOX2a* 基因启动子的顺式作用元件进行预测,发现启动子上有多个不同类型的响应元件,比如光响应元件(photo responsive element)、激素响应元件(hormone response element)和胁迫响应元件(stress related component)。其中,激素响应元件包括 ABA 响应元件、MeJA 响应元件、GA 响应元件和 SA 响应元件(表 3)。



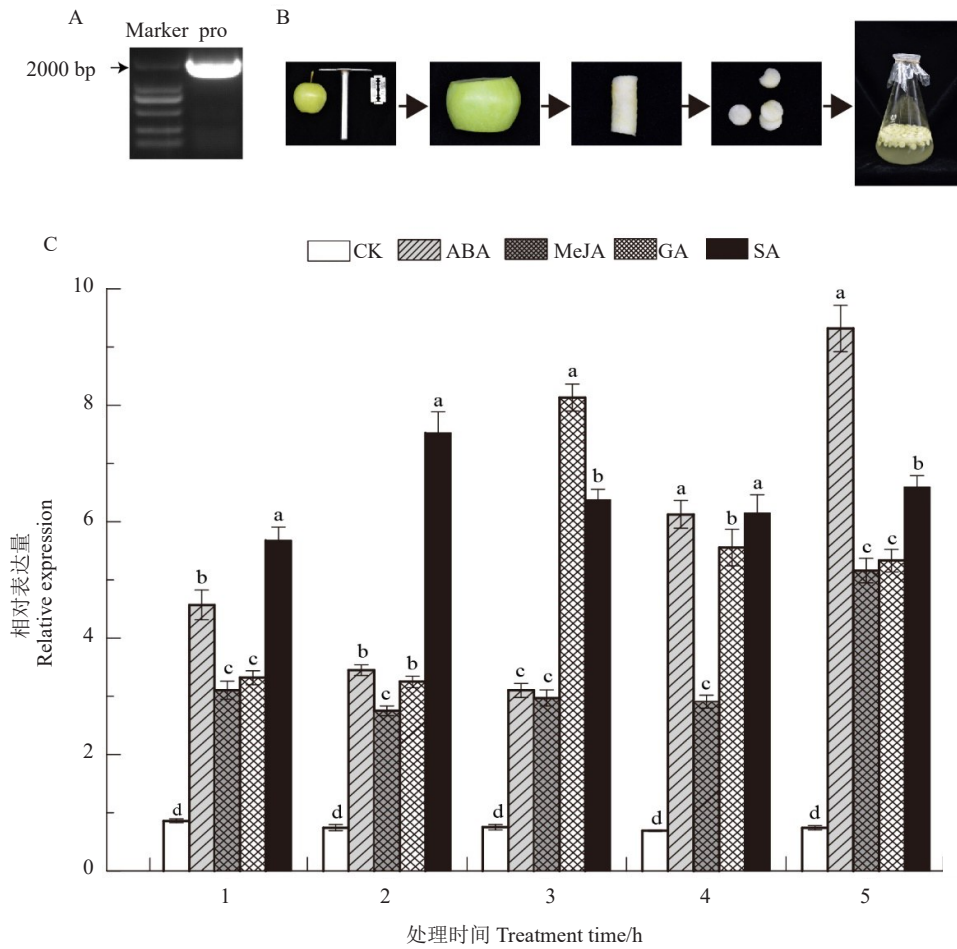
槟子组织部位及果实发育阶段
Tissues and fruit developmental stages of Binzi

不同小写字母代表样本间的差异显著($p < 0.05$)。下同。

Different small letters indicate significant differences of the independent sample *t*-test ($p < 0.05$). The same below.

图 6 槟子 *LOX2a* 在不同组织部位和果实发育阶段的相对表达量

Fig. 6 Relative expression level of Binzi *LOX2a* in different tissues and developmental stages of fruit



A. Pro. 克隆出的 *LOX2a* 启动子; B. 圆片温育实验操作流程; C. 外源激素处理槟子果实后的 *LOX2a* 基因表达水平变化。
 A. Pro. The promoter of *LOX2a*; B. The operational process of fruit disc tissue incubation; C. Expression levels of *LOX2a* in Binzi fruit with treatment of different exogenous hormone.

图 7 不同外源激素处理槟子果实后的 *LOX2a* 基因表达水平变化

Fig. 7 Expression levels of *LOX2a* in Binzi fruit with treatment of different exogenous hormone

表 3 槟子 *LOX2a* 启动子顺式作用元件

Table 3 The *cis*-acting regulatory elements in promoter of Binzi *LOX2a*

元件类型 Component type	相关元件 Related component	数量 Number	功能注释 Functional comment
光响应元件 Photo responsive element	Box 4	2	光响应元件 Photo responsive element
	G-Box	3	光响应元件 Photo responsive element
	GA-motif	1	光响应元件 Photo responsive element
	GATA-motif	1	光响应元件 Photo responsive element
	GT1-motif	1	光响应元件 Photo responsive element
	MRE	1	光响应元件 Photo responsive element
	TCT-motif	1	光响应元件 Photo responsive element
激素响应元件 Hormone response element	ABRE	3	ABA 响应元件 Abscisic acid response element
	CGTCA-motif	1	茉莉酸甲酯响应元件 MeJA response element
	TGACG-motif	1	茉莉酸甲酯响应元件 MeJA response element
	P-box	1	赤霉素响应元件 Gibberellin responsive element
	TCA-element	1	水杨酸响应元件 Salicylic acid responsive element
胁迫相关元件 Stress related component	MBS	1	干旱响应元件 Drought responsive element
	ARE	1	厌氧响应元件 Anaerobic responsive element

结果表明, $LOX2a$ 基因的表达很可能受到激素的调控。

为了验证激素是否调控 $LOX2a$ 基因表达,设计了槟子果实圆片温育试验,用ABA、MeJA、GA和SA四种激素处理果实圆片,通过实时荧光定量PCR检测 $LOX2a$ 基因表达水平的变化(图7-B~C)。结果表明,4种激素处理后的 $LOX2a$ 基因表达水平都明显高于对照组,并且呈现出不同的表达趋势。ABA实验组的 $LOX2a$ 基因表达呈现出先下降后升高的趋势,尤其是在5 h表达量最高;MeJA处理后提高了 $LOX2a$ 基因的表达水平,但在处理后的1~4 h变化不明显,5 h时表达水平最高;GA处理3 h时, $LOX2a$ 基因的表达量最高,随着处理时间延长其表达量逐渐

降低;SA试验组的 $LOX2a$ 基因表达水平在2 h时达到最高,随后下降并维持在较为恒定的表达水平。在1种激素处理1 h后,SA组的 $LOX2a$ 基因表达水平最高,其次是ABA,最后是MeJA和GA。综上所述,槟子 $LOX2a$ 基因表达受到ABA、MeJA、GA和SA四种激素的调控,并且响应ABA和SA的调控更为明显。

乙烯是促进苹果果实发育成熟的重要激素之一。为了探究乙烯对槟子 $LOX2a$ 基因表达的调控,本研究开展了乙烯及其抑制剂1-MCP处理槟子果实的实验。结果如图8所示,乙烯促进槟子果实成熟,而1-MCP的处理结果则相反:与对照相比,乙烯处理后 $LOX2a$ 基因表达水平升高,1-MCP处理组的 $LOX2a$ 基因表达量低于对照组。以上结果表明,

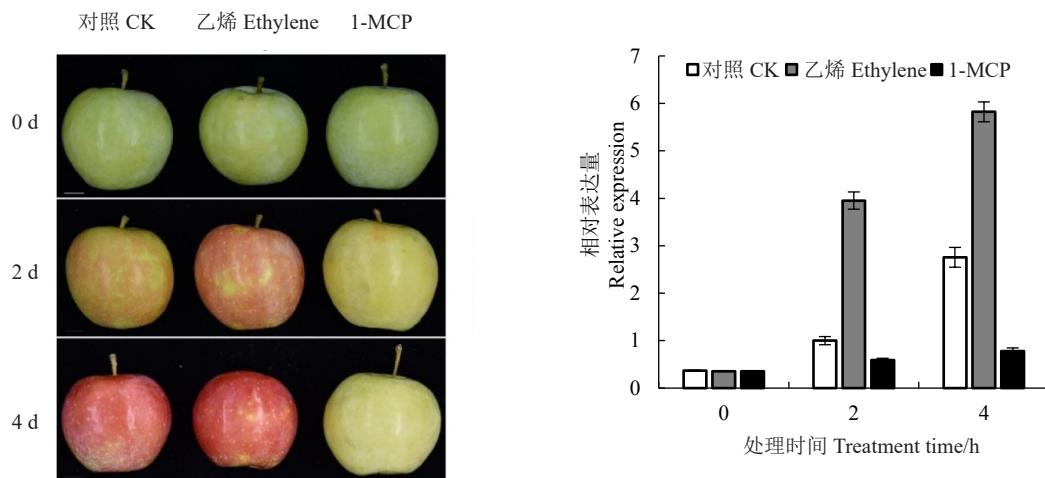


图8 乙烯与1-MCP对槟子 $LOX2a$ 基因表达的影响

Fig. 8 Effects of ethylene and 1-MCP on Binzi $LOX2a$ gene expression

$LOX2a$ 基因表达受到乙烯的诱导。

3 讨论

目前,果树育种方向主要在提高果实产量、增强植物抗逆性等方面,对果实香气等风味品质的关注相对较少^[23-24]。但是,香气通过赋予果实独特的风味特征,在很大程度上吸引了消费者的购买欲望^[25-28]。槟子作为我国传统的果树资源,果实色泽艳丽、香气浓郁,但是关于其香气形成的研究还未见报道。因此,挖掘出香气相关的基因,对解析槟子香气浓郁的分子机制具有重要作用。

脂氧合酶LOX是植物香气代谢中脂氧合酶途径的起始酶,在植物香气积累中扮演重要角色^[4]。本研究以槟子转录组数据为基础,克隆出槟子 $LOX2a$ 基因。槟子 $LOX2a$ 有且只有一个Lipoxygenase功能

域,且系统发育分析结果表明,其与苹果、梨、山荆子、草莓等蔷薇科植物的进化关系较近,说明 $LOX2a$ 在基因进化过程中结构和功能较为保守。

关于 LOX 基因表达模式已有一些研究, $LOXs$ 基因在植物器官(根、茎、叶、花、果实、种子等)和细胞器(叶绿体、细胞质等)中具有广泛分布的特点^[29]。辣椒 $LOX2a$ 基因在叶片中表达量最高,花中表达量最低^[20]。马铃薯 $StLOXH1$ 在叶片中表达最高,而 $StLOXH3$ 主要在根中表达^[30]。研究发现,苹果 $MdLOX1a$ 基因在果皮中表达最高,在根、茎、叶等器官有少量表达^[21]。槟子 $LOX2a$ 基因表达模式表明,其在根部表达量最高,其次是茎、叶、花,种子中表达量最低。研究表明,脂氧合酶LOX在调控植物生长发育、成熟衰老以及逆境胁迫中发挥重要作用^[31]。番茄中过表达 $tomLOXD$ 能够提高抗逆基因

LeHSP90、*LePR1*、*LePR6* 和 *LeZAT* 的表达量^[32]。根作为植物“隐藏”的敏感器官,在响应逆境胁迫过程中发挥重要作用^[33-34]。槟子 *LOX2a* 基因在根部表达水平是果实的近 20 倍,表明 *LOX2a* 不仅与果实香气合成有关,而且可能参与了响应逆境胁迫的生理过程。苹果果实在发育早期主要以醛类物质为主,成熟时以酯类物质为主^[35-36]。通过对槟子果实不同发育成熟时期的荧光定量 PCR 检测,发现 *LOX2a* 在花后 30 d 时表达量最高,随后下降并维持在一定水平,在 150 d 时表达量升高。结果表明,成熟期 *LOX2a* 基因的表达可能促进了果实酯类香气物质的积累,而花后 30 d 时表达量最高,意味着 *LOX2a* 可能不仅参与香气合成,而且可能参与了诸如果实生长发育等过程。

LOX 作为植物中一类具有多种生理功能的酶,其基因的表达受到茉莉酸、生长素、乙烯等激素的调控^[19,37-38]。通过对茶树进行茉莉酸甲酯处理,发现有 3 个 *CsLOX* 基因表达水平发生上调,其中 *CsLOX1* 基因表达量上调 117 倍^[39]。乙烯能够促进苹果 *Md-LOX* 基因的表达和挥发性酯类物质的积累,并且在乙烯处理 21 d 后,促进效果仍然明显^[37]。本研究发现槟子 *LOX2a* 基因启动子区域含有脱落酸、茉莉酸甲酯、赤霉素和水杨酸等激素响应元件,推测 *LOX2a* 基因表达可能受到这 4 种激素的诱导。为此,结合圆片温育和外源激素处理实验,发现脱落酸、茉莉酸甲酯、赤霉素和水杨酸处理后, *LOX2a* 基因表达明显受到诱导,而且响应 ABA 和 SA 的调控更为明显。此外,在 *LOX2a* 基因启动子区域上还存有与光和胁迫相关的作用元件,表明 *LOX2a* 基因的表达可能受到多种因素的诱导。槟子与苹果一样,是典型的呼吸跃变型果实,而且乙烯在苹果果实成熟过程中发挥重要作用^[37]。本研究通过乙烯及其抑制剂 1-MCP 处理槟子果实,发现 *LOX2a* 基因的表达受到乙烯的诱导。香气物质代谢与激素密不可分,研究发现茉莉酸甲酯^[19]、脱落酸^[40]、乙烯^[7]、赤霉素^[41] 等多种激素参与了植物香气物质的积累,但关于激素通过哪些主效基因来调控香气物质代谢的研究相对较少,需要进一步开展相关的研究工作。综上, *LOX2a* 基因可能通过多种激素信号转导途径参与槟子果实的香气代谢及其他生物过程。

4 结 论

笔者以香气浓郁的槟子果实为试验材料,以转录组数据为基础,克隆出槟子 *LOX2a* 基因,对 *LOX2a* 基因的功能域、系统发育进化、时空表达及启动子顺式作用元件等内容进行分析,并通过圆片温育探究了外源激素对 *LOX2a* 基因的诱导表达情况。证明了 *LOX2a* 基因是典型的 *LOX* 家族基因,定位在细胞质,在根部表达量最高,其表达受到脱落酸、茉莉酸甲酯、赤霉素、水杨酸和乙烯的调控,推测 *LOX2a* 基因可能通过多种激素信号转导途径参与槟子果实的香气代谢过程,为解析槟子香气浓郁的分子机制奠定了研究基础。

参考文献 References:

- [1] 王中英. 太谷槟子[J]. 山西大学学报(自然科学版), 1960(1): 114-128.
WANG Zhongying. Taigu Binzi[J]. Journal of Shanxi University (Natural Science Edition), 1960(1): 114-128.
- [2] 李育农. 苹果属植物种质资源研究[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
LI Yunong. Study on germplasm resources of apple plants[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2001.
- [3] 陆秋农, 贾定贤. 中国果树志·苹果卷[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 中国林业出版社, 1999: 187.
LU Qiunong, JIA Dingxian. Chinese fruit tree · Apple[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, China Forestry Press, 1999: 187.
- [4] 安常娥, 王怀忠. 槟子树栽培技术要点[J]. 现代农村科技, 2022(1): 46-47.
AN Chang'e, WANG Huaizhong. Key points of Binzi tree cultivation technology[J]. Xiandai Nongcun Keji, 2022(1): 46-47.
- [5] ESPINO- DIAZ M, SEPULVEDA D R, GONZALEZ- AGUILAR G, OLIVAS G I. Biochemistry of apple aroma[J]. Food Technology and Biotechnology, 2016, 54(4): 375-394.
- [6] 陈发兴, 郑少泉, 蒋际谋. 果实香气成分和生物合成代谢研究进展[J]. 福建果树, 2010(2): 26-30.
CHEN Faxing, ZHENG Shaoquan, JIANG Jimou. Advances in fruit aroma composition and biosynthetic metabolism[J]. Fujian Fruits, 2010(2): 26-30.
- [7] QI W Y, WANG H J, ZHOU Z, YANG P, WU W B, LI Z M, LI X. Ethylene emission as a potential indicator of Fuji apple flavor quality evaluation under low temperature[J]. Horticultural Plant Journal, 2020, 6(4): 231-239.
- [8] YAN D, SHI J R, REN X L, TAO Y S, MA F W, LI R, LIU X R, LIU C H. Insights into the aroma profiles and characteristic aroma of 'Honeycrisp' apple (*Malus × domestica*) [J/OL]. Food Chemistry, 2020, 327: 127074. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127074>.
- [9] ECHEVERRIA G, GRAELL J, LOPEZ M L, LARA I. Volatile

- production, quality and aroma-related enzyme activities during maturation of 'Fuji' apples[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2004, 31: 217-227.
- [10] DEFILIPPI B G, KADER A A, DANDEKAR A M. Apple aroma: Alcohol acyltransferase, a rate limiting step for ester biosynthesis, is regulated by ethylene[J]. *Plant Science*, 2005, 168: 1199-1210.
- [11] RUGKONG A, MCQUINN R, GIOVANNONI J J, ROSE J K C, WATKONS C B. Expression of ripening-related genes in cold-stored tomato fruit[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2011, 61(1): 1-14.
- [12] 徐坤范, 王明林, 艾希珍. 日光温室黄瓜发育过程中主要芳香物质和脂肪酸含量的变化[J]. *西北植物学报*, 2009, 29(2): 390-396.
- XU Kunfan, WANG Minglin, AI Xizhen. Changes of main aromatic compounds and fatty acids contents of cucumber fruits during development in solar-greenhouse[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2009, 29(2): 390-396.
- [13] CONTRERAS C H, BEAUDRY R. Lipoxygenase-associated apple volatiles and their relationship with aroma perception during ripening[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2013, 82: 28-38.
- [14] WANG S S, SAITO T, OHKAWA K, OHARA K, SUKTAWEE S, IKEURA H, KNODO S. Abscisic acid is involved in aromatic ester biosynthesis related with ethylene in green apples[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2018, 221: 85-93.
- [15] 王欢欢, 马越, 白冰, 王宇滨, 赵晓燕, 张超. 番茄果实呈香组分及其代谢途径研究进展[J]. *中国瓜菜*, 2018, 31(12): 1-4.
- WANG Huanhuan, MA Yue, BAI Bing, WANG Yubin, ZHAO Xiaoyan, ZHANG Chao. Progress of aroma volatiles of tomato fruit and their metabolic pathway[J]. *China Cucurbits and Vegetables*, 2018, 31(12): 1-4.
- [16] CHEN G P, HACKETT R, WALKER D, TAYLOR A, LIN Z F, GRIERSON D. Identification of a specific isoform of tomato lipoxygenase (*TomloxC*) involved in the generation of fatty acid-derived flavor compounds[J]. *Plant Physiology*, 2004, 136(1): 2641-2651.
- [17] ZHANG B, CKEN K S, BOWEN J, ALLAN A, ESPLEY R, KARUNAIRETNAM S, FERGUSON I. Differential expression within the LOX gene family in ripening kiwifruit[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(14): 3825-3836.
- [18] LI M, LI L T, DUNWELL J M, QIAO X, LIU X, ZHANG S L. Characterization of the lipoxygenase (LOX) gene family in the Chinese white pear (*Pyrus bretschneideri*) and comparison with other members of the Rosaceae[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 444.
- [19] LUO M L, ZHOU X, HAO Y, SUN H J, ZHOU Q, SUN Y Y, JI S J. Methyl jasmonate pretreatment improves aroma quality of cold-stored 'Nanguo' pears by promoting ester biosynthesis[J/OL]. *Food Chemistry*, 2021, 338: 127846. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127846>.
- [20] 贾庆利, 巩振辉, 李大伟. 辣椒定位于叶绿体的13-脂氧合酶基因(*CaLOX2*)克隆及表达分析[J]. *农业生物技术学报*, 2012, 20(10): 1126-1134.
- JIA Qingli, GONG Zhenhui, LI Dawei. Cloning and expression characterization of chloroplast-targeted 13-lipoxygenase gene (*CaLOX2*) in *Capsicum annuum* L.[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2012, 20(10): 1126-1134.
- [21] 岳璇璇, 王庆鹏, 房鸿成, 胡甲飞, 苏梦雨, 王楠, 张宗营, 陈学森. 苹果脂氧合酶基因 *MdLOX1a* 的同源克隆与功能验证[J]. *植物遗传资源学报*, 2020, 21(3): 734-742.
- YUE Xuanxuan, WANG Qingpeng, FANG Hongcheng, HU Jiafei, SU Mengyu, WANG Nan, ZHANG Zongying, CHEN Xuesen. Homologous cloning and expression analysis of apple lipoxygenase gene *MdLOX1a*[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2020, 21(3): 734-742.
- [22] 侯柄竹. ABA 调控草莓果实成熟的细胞信号转导分子机制[D]. 北京: 中国农业大学, 2018.
- HOU Bingzhu. Molecular mechanisms for ABA signaling transduction in regulation of strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruit ripening[D]. Beijing: China Agricultural University, 2018.
- [23] TIEMAN D, ZHU G T, RESENDE M F R, LIN T, NGUYEN C, BIES D, RANBLA J L, BELTRAN K S O, TAYLOR M, ZHANG B, IKEDA H, LIU Z Y, FISHER J, ZEMACH I, MONFORTE A, ZAMIR D, GRANELL A, KIRST M, HUANG S W, KLEE H. A chemical genetic roadmap to improved tomato flavor[J]. *Science*, 2017, 355(6323): 391-394.
- [24] CAO X M, WEI C Y, DUAN W Y, CAO Y, KUANG J F, LIU M C, CHEN K S, KLEE H, ZHANG B. Transcriptional and epigenetic analysis reveals that NAC transcription factors regulate fruit flavor ester biosynthesis[J]. *Plant Journal*, 2021, 106(3): 785-800.
- [25] LEWINSOHN E, SCHALECHE F, WILKINSON J, MATSUI K, TADMOR Y, NAM K H, AMAR O, LASTOCHKIN E, LARKOV O, RAVID U, HIATT W, GEPSTEIN S, PICHERSKY E. Enhanced levels of the aroma and flavor compound S-Linalool by metabolic engineering of the terpenoid pathway in tomato fruits[J]. *Plant Physiology*, 2001, 127(3): 1256-1265.
- [26] DEFILIPPI B G, MANRIQUEZ D, LUENGWILAI K. Chapter 1 aroma volatiles: Biosynthesis and mechanisms of modulation during fruit ripening[J]. *Advances in Botanical Research*, 2009, 50: 1-37.
- [27] 宋丽娟, 李雄伟, 陈琳, 柴明良, 高中山. 果实香气合成与遗传控制研究概述[J]. *果树学报*, 2008, 25(5): 708-713.
- SONG Lijuan, LI Xiongwei, CHEN Lin, CHAI Mingliang, GAO Zhongshan. A review on fruit aroma synthesis and its genetic control[J]. *Journal of Fruit Science*, 2008, 25(5): 708-713.
- [28] 李旺雄, 唐中祺, 程鸿, 孔维萍, 罗石磊. 不同甜瓜品种贮藏期间品质变化和风味物质分析[J]. *中国瓜菜*, 2021, 34(9): 50-55.
- LI Wangxiong, TANG Zhongqi, CHENG Hong, KONG

- Weiping, LUO Shilei. Analysis of quality changes and flavor substances of different melon varieties during storage[J]. *China Cucurbits and Vegetables*, 2021, 34(9):50-55.
- [29] 林馨颖,王鹏杰,陈雪津,郭永春,谷梦雅,郑玉成,叶乃兴. 茶树 LOX 基因家族的鉴定及其在白茶萎凋过程的表达分析[J]. *茶叶科学*, 2021, 41(4):482-496.
- LI Xinying, WANG Pengjie, CHEN Xuejin, GUO Yongchun, GU Mengya, ZHENG Yucheng, YE Naixing. Identification of LOX gene family in *Camellia sinensis* and expression analysis in the process of white tea withering[J]. *Journal of Tea Science*, 2021, 41(4):482-496.
- [30] ROYO J, VANCANNEYT G, Perez A G, SANZ C, STORMANN K, ROSAHL S, SANCHEZ-SERRANA J J. Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(35):21012-21019.
- [31] SIEDOW J N. Plant lipoxygenase: Structure and function[J]. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1991, 42(1):145-188.
- [32] HU T Z, ZENG H, HU Z L, QU X X, CHEN G P. Over-expression of the tomato 13- lipoxygenase gene *TomloxD*, increases generation of endogenous jasmonic acid and resistance to *Cladosporium fulvum*, and high temperature[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2013, 31(5):1141-1149.
- [33] HENDRICKS J J, NADELHOFFER K J, ABER J D. Assessing the role of fine roots in carbon and nutrient cycling[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 1993, 8(5):174-178.
- [34] 黄爱梅,方毅,孙俊,李锦隆,胡丹丹,钟全林,程栋梁. 武夷山不同海拔毛竹细根功能性状研究[J/OL]. *生态学报*, 2023(1): 1- 10. [2022- 08- 17]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2031.Q.20220826.1112.036.html>.
- HUANG Aimei, FANG Yi, SUN Jun, LI Jinglong, HU Dandan, ZHONG Quanlin, CHENG Dongliang. Fine root traits of *Phyllostachys edulis* at different altitudes in Wuyi Mountain[J/OL]. *Acta Ecologica Sinica*, 2023(1): 1-10 [2022-08-17]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2031.Q.20220826.1112.036.html>.
- [35] [CONTRERAS C H, TJELLSTROM H, BEAUDRY R M. Relationships between free and esterified fatty acids and LOX-derived volatiles during ripening in apple[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2015, 112:105-113.
- [36] LIU X J, HAO N N, FENG R F, MENG Z P, LI Y N, ZHAO Z Y. Transcriptome and metabolite profiling analyses provide insight into volatile compounds of the apple cultivar 'Ruixue' and its parents during fruit development[J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1):231.
- [37] YANG X T, SONG J, DU L N, CHARLES F, CAMPBELL-PALMER L, FILLMORE S, PAUL W, ZHANG Z Q. Ethylene and 1-MCP regulate major volatile biosynthetic pathways in apple fruit[J]. *Food Chemistry*, 2016, 194:325-336.
- [38] WU Q, TAO X Y, AI X Z, LUO Z S, MAO L C, YING T J, LI L. Effect of exogenous auxin on aroma volatiles of cherry tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit during postharvest ripening[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2018, 146:108-116.
- [39] ZHU J Y, WANG X W, GUO L X, XU Q S, ZHAO S Q, LI F D, YAN X M, LIU S R, WEI C L. Characterization and alternative splicing profiles of the lipoxygenase gene family in tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. *Plant Cell Physiology*, 2018, 59(9):1765-1781.
- [40] WU Q, TAO X Y, AI X Z, LUO Z S, MAO L C, YING T J, LI L. Contribution of abscisic acid to aromatic volatiles in cherry tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit during postharvest ripening[J]. *Plant Physiology & Biochemistry*, 2018, 130:205-214.
- [41] 贺凌霄,薛刚,孙聚涛,张智强,丁永乐,杨铁钊,徐世晓,程昌合. 外源赤霉素对烤烟叶面腺毛和香气物质的影响[J]. *河南农业科学*, 2021, 50(1):52-59.
- HE Lingxiao, XUE Gang, SUN Jutao, ZHANG Zhiqiang, DING Yongle, YANG Tiezhao, XU Shixiao, CHENG Changhe. Effects of exogenous gibberellin on flue-cured tobacco leaf trichome and aromatic substances[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2021, 50(1):52-59.