

苹果脂氧合酶基因 *MdLOX1a* 的同源克隆与功能验证

岳璇璇, 王庆鹏, 房鸿成, 胡甲飞, 苏梦雨, 王楠, 张宗营, 陈学森

(山东农业大学园艺科学与工程学院 / 作物生物学国家重点实验室, 泰安 271018)

摘要: 脂氧合酶是脂肪酸代谢途径中的关键酶, 在植物生长发育、响应环境胁迫、合成香气物质等方面起着重要作用。本试验以紫红3号叶片诱导的红色愈伤组织为试材, 对 *MdLOX1a* 基因及其部分启动子序列进行扩增。测序发现 *MdLOX1a* 的开放阅读框为 2592 bp, 编码 863 个氨基酸, 预测其蛋白分子量为 97.69 kD, 等电点为 5.14。 *MdLOX1a* 定位于苹果基因组的第9号染色体, 由 8 个外显子与 7 个内含子构成。氨基酸序列进化树分析表明, *MdLOX1a* 与 *Pb9S-LOX5* 在同一进化枝。此外, 克隆获得 *MdLOX1a* 启动子序列 1058 bp, 启动子元件预测表明该启动子包括响应多种胁迫的顺式作用元件。亚细胞定位发现, *MdLOX1a* 在细胞膜与细胞核上均有定位。组织差异分析表明, *MdLOX1a* 基因在果皮中的表达量最高, 在花和果肉中次之; 同时随着果实成熟 *MdLOX1a* 基因的表达量上调并且短时间光照能够诱导 *MdLOX1a* 基因表达, 低温 (16 ℃) 以及不同浓度的外源 ABA 处理后, *MdLOX1a* 基因的表达量均明显降低。过表达 *MdLOX1a* 验证发现较于对照组, 实验组香气各成分有不同程度增加, 说明 *MdLOX1a* 与香气物质的合成有关。

关键词: 苹果; *MdLOX1a*; 表达分析; 亚细胞定位; 功能验证

Homologous Cloning and Expression Analysis of Apple Lipxygenase Gene *MdLOX1a*

YUE Xuan-xuan, WANG Qing-peng, FANG Hong-cheng, HU Jia-fei, SU Meng-yu,

WANG Nan, ZHANG Zong-ying, CHEN Xue-sen

(College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University/State Key Laboratory of Crop Biology, Tai'an 271018)

Abstract: Lipxygenase is a key enzyme involved in the pathway of fatty acid metabolism, and plays an important role in the growth and development of plants, responses to environmental stresses and the synthesis of aroma components. In this study, the red callus from the leaves of 'Zihong 3' was used for PCR amplification of the *MdLOX1a* gene and its partial promoter sequence. Sequencing analysis revealed that *MdLOX1a* has an open reading frame of 2592 bp encoding for 863 deduced amino acids, with a predicted protein molecular weight of 97.69 kD and the isoelectric point of 5.14. The *MdLOX1a* gene was found to be localized on chromosome 9 of the apple genome, consisting of 8 exons and 7 introns. Phylogenetic tree analysis with amino acid sequence indicated that *MdLOX1a* and *Pb9S-LOX5* were assigned within the same branch. In addition, we obtained the *MdLOX1a* promoter sequence with a length of 1058 bp, which contained several *cis*-acting elements in response to various stresses. Subcellular localization revealed that *MdLOX1a* was localized on both the cell membrane and the nucleus. The tissue disparity analysis showed that the expression level of *MdLOX1a* gene was abundant in the pericarp, followed by flower and pulp. The expression of *MdLOX1a* gene gradually increased

收稿日期: 2019-07-31 修回日期: 2019-09-18 网络出版日期: 2019-10-11

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190731001>

第一作者研究方向为落叶果树种质资源与遗传育种, E-mail: yue1926125893@163.com

通信作者: 张宗营, 研究方向为落叶果树种质资源与遗传育种, E-mail: zzy1357924680@126.com

陈学森, 研究方向为落叶果树种质资源与遗传育种, E-mail: chanyetixi@163.com

基金项目: 国家自然科学基金 (31730080, 31701892); 国家重点研发计划项目 (2016YFC0501505)

Foundation project: The National Natural Science Foundation of China (31730080, 31701892), The National Key Research and Development Project (2016YFC0501505)

with fruit ripening, and its transcription has been induced under continuous light treatment. The expression of *MdLOX1a* gene was significantly reduced after low temperature (16 °C) and exogenous ABA treatment at different concentrations. The overexpression of *MdLOX1a* showed that the transgenic lines showed the induction of the aromatic components in relative to the control lines, suggesting that *MdLOX1a* might associate with the synthesis of aroma components.

Key words: apple; *MdLOX1a*; expression analysis; subcellular localization; functional verification

脂氧合酶(LOX, lipoxygenase)是一类含非血红素铁的双加氧酶,广泛存在于动植物和微生物中^[1],此类物质属于脂氧合酶超家族,以多基因家族的形式存在于植物中,由于在不同植物中的表达情况不同,LOX基因在功能上也产生相应差异。近年来,LOX基因已在大豆^[2]、黄瓜^[3]、甜瓜^[4]、猕猴桃^[5-6]、番茄^[7]、桃^[8]、柿子^[9]、甘蔗^[10]、苹果^[11]等多种物种中进行了研究,指出LOX基因参与植物响应胁迫、果实成熟、香气物质合成、果实软化等过程。在富平柿研究中,*DkLOX3*基因经外源ABA处理后诱导表达,然而在外源赤霉素(GA, gibberellins)与水杨酸(SA, salicylic acid)处理后该基因表达被抑制^[9];甘蔗*ScLOX1*在NaCl、PEG处理下诱导表达^[10];辣椒中,茉莉酸甲酯(MeJA, methyl jasmonate)、SA和过氧化氢(H₂O₂, hydrogen peroxide)均诱导*CaLOX2*基因上调表达,低温抑制其表达^[12];现有研究发现LOX参与茉莉酸的合成,茉莉酸影响种子萌发进而提高植物对干旱的耐受能力^[13]。以上研究表明,脂氧合酶基因LOX参与多种植物抵御生物与非生物胁迫的过程从而调控植物生长发育,但在苹果中的研究较少。另外,脂氧合酶是脂肪酸氧化途径中的第一个关键酶,主要通过催化亚麻酸(LeA, linolenic acid)和亚油酸(LA, linoleic acid)等不饱和脂肪酸的加氧反应生成氢过氧化物(HPOs, hydroperoxides),随即被继续代谢,产生具有不同生物学功能的化合物,包括含有6个碳原子的醛类和醇类(C6 GLVs, C6 green leafy volatiles)以及茉莉酸(JA, jasmonic acid)^[13]等化合物,其中C6 GLVs依次经醇脱氢酶(ADH, alcohol dehydrogenase)、醇酰基转移酶(AAT, alcohol acyl transferase)催化形成酯类物质,以上即为大部分植物香气物质合成的脂肪酸途径。近几年报道表明,脂氧合酶基因参与植物香气挥发性物质的生成,黄瓜品系EP326与DE843报道提出*Csa007837*基因对控制黄瓜果实芳香物质的合成起到了关键作用^[3];在烟草中的研究表明,香气物质己醛与(3-Z)-己烯醛的合成依赖*NaLOX2*的参与,下调该

基因表达则会减少GLVs生成^[14];在桃^[15]与猕猴桃^[5]中也发现LOX基因参与C6醛类相关物质合成的过程;还有报道指出,过表达*CmLOX03*后薄皮甜瓜的脂类香气物质含量增多,但*CmLOX04*未有此结果^[16]。近期苹果中也有相关报道,Vogt等^[17]提出*MdLOX1a*和*MdLOX5e*是苹果果实香气挥发性物质产生的候选基因,同时,本课题组发现,红心9号与红心7号2个苹果株系在贮藏期间,随着香气总物质含量的增多,LOX基因表达量也逐渐升高^[1],但均未进行深入的机理研究。基于前人的结论,本试验将对*MdLOX1a*展开进一步探讨,为揭示*MdLOX1a*调控香气物质合成机理和提高果实品质提供理论依据。

苹果(*Malus domestica* (Suckow) Borkh.)系蔷薇科苹果亚科苹果属,因其风味特殊、色泽鲜艳及营养价值较高等倍受欢迎^[18]。近年来,随着现代分子生物学技术的应用,苹果遗传育种及果实品质性状发育的分子机理是研究热点之一,本课题组利用以新疆野苹果和它的红肉变型为亲本而建立的杂种分离群体为试验材料,开展在果实品质形成和调控机理等多方面的研究^[19-20]。本研究以紫红3号红肉愈伤为试材,克隆得到*MdLOX1a*基因编码区全长并对其进行生物信息学分析、表达分析、亚细胞定位及过表达*MdLOX1a*的功能验证,为深入研究*MdLOX1a*基因功能奠定基础,并为改善红肉苹果果实品质提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料及处理

试验于2018年在山东农业大学作物生物学国家重点实验室和聊城冠县育种基地完成。选材为新疆红肉苹果的杂交后代美红^[21]、紫红3号愈伤组织与王林苹果愈伤组织。于聊城冠县育种基地取杂种后代的果实、根、茎尖、花与叶片,液氮冷冻,保存于超低温冰箱。将长势一致的红色愈伤组织(以新疆红肉苹果与富士苹果杂交的F₁分离群体中选出紫红3号的红色展开幼嫩叶片为外植体诱导)接

种至继代培养基^[22],每天给予 16 h 光照与 8 h 黑暗, 24 ℃ 培养; 在生长 15 d 左右时各进行低温 (16 ℃) 与光照 (持续光照) 处理, 分别在 0 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h、48 h 取样, 液氮速冻后 -80 ℃ 保存; 在生长 15 d 左右时进行外源脱落酸 (ABA, abscisic acid) 的处理, 浓度分别为 0、60、120、180、240、300 μmol/L, 4 d 时取样, 液氮速冻后 -80 ℃ 保存。以上每个处理至少进行 3 次生物学重复。

1.2 总 DNA 提取与实时荧光定量分析

总 RNA 的提取参照康为世纪 OminiPlant RNA Kit 操作说明。反转录合成 cDNA 使用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) 试剂盒。实时荧光定量 PCR (qRT-PCR, quantitative real-time PCR) 使用伯乐 CFX96 荧光定量仪, 包括 Tip Green Qpcr SuperMix (荧光定量预混液) 10.0 μL、ddH₂O 7.0 μL、cDNA 模板 (50 ng/mL) 1.0 μL、上下游引物各 1.0 μL (5 mmol/L), 总反应体系为 20.0 μL。运行程序为: 预变性 95.0 ℃ 30 s; 变性 95.0 ℃ 5 s, 退火 58 ℃ 10 s, 延伸 72.0 ℃ 30 s, 40~45 个循环。每个样孔设置 3 个重复。将苹果肌动蛋白 *MdActin*^[23] 作为 qRT-PCR 数据分析内参, 荧光定量数据依据 Kenneth 等^[24] 的方法处理分析。参照康为世纪 Plant Genomic DNA Kit 操作说明提取苹果基因组 DNA。

表 1 基因克隆及 qRT-PCR 引物序列

Table1 Primers for gene cloning and qRT-PCR and the sequences

引物名称	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
Name of primers	Forward primers (5'-3')	Reverse primers (5'-3')
<i>MdLOX1a</i>	ATGTTGCACAACCTGCTTG	TTAGATAGAGACGCTGTTGGGA
<i>MdLOX1a</i> -PRI101 (F: <i>Sma</i> I/R: <i>Kpn</i> I)	CCCGGGATGTTGCACAACCTGCTTG	GGTACCGATAGAGACGCTGTTGGGA
<i>MdLOX1a</i> -pET32a (F: <i>Eco</i> RV/R: <i>Xho</i> I)	GATATCATGTTGCACAACCTGCTTG	CTCGAGTTAGATAGAGACGCTGTTGGGA
Pro <i>MdLOX1a</i>	GAATTCTCGGGAGGAAAAATCGGGT	GTGTTCTAGTTTCCAAGAACTAA
<i>MdLOX1a</i> -(qRT)	GGACTAACAGTGGATGAG	GAGAGTTCTGCTACCATAG
<i>MdActin</i>	TGACCGAATGAGCAAGGAAATTACT	TACTCAGCTTTGGCAATCCACATC

1.4 载体构建和亚细胞定位

为进一步验证 *MdLOX1a* 蛋白的位置, 设计所用上下游引物 (表 1), 将 CDS 去终止密码子后连接 pRI101-AN 载体, 构建 35S: *MdLOX1a*-GFP 融合载体并转化根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 感受态细胞, 试验具体方法参照 Xu 等^[25], 以 PRI101-GFP 载体转化根癌农杆菌的王林愈伤组织作为对照组。利用 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI, 4', 6-diamidino-2-phenylindole) 对细胞核染色, 并使用荧光显微镜 (Olympus BX53F, Tokyo, Japan) 检测。

1.3 *MdLOX1a* 克隆与生物信息学分析

于 NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 查找 *MdLOX1a* 基因序列及起始密码子上游的启动子序列, 编码该蛋白的基因序列号为 LOC103411221, 设计基因上下游引物 F (5'-ATGTTGCACAACCTGCTTG-3') 和 R (5'-TTAGATAGAGACGCTGTTGGGA-3') (表 1), 以 cDNA 为模板利用 RT-PCR (RT-PCR, reverse transcription-PCR) 技术克隆编码区全长。设计启动子上下游引物 F (5'-TCGGGAGGAAAAATCGGGT-3') 和 R (5'-TGTGTTCTAGTTTCCAAGAACTAATTAAGC-3') (表 1), 以 DNA 为模板利用 RT-PCR 技术扩增。具体反应体系: 14.5 μL ddH₂O、5 μL 5 × HF Buffer、2.5 μL 10 mmol/L dNTP、1 μL 模板、上下游引物各 1 μL、0.5 μL 酶。 *MdLOX1a* 的 RT-PCR 克隆程序为: 98 ℃ 30 s; 98 ℃ 10 s, 58.5 ℃ 30 s, 72 ℃ 120 s, 35 个循环; 72 ℃ 10 min。 *MdLOX1a* 启动子的扩增程序同上, 仅第 2 阶段孵育 30 s 时温度设为 60 ℃。扩增产物经电泳回收目的条带, 连接 pLB (VT205) 载体送测序。通过 Expasy 网站对 *MdLOX1a* 蛋白进行理化性质分析, 用 NCBI 网站进行 *MdLOX1a* 基因组结构的构建, 使用 MEGA 5.1 软件构建系统进化树, 并用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 数据库对 *MdLOX1a* 部分启动子的顺式作用元件进行预测。

1.5 香气挥发性成分测定

以王林愈伤为试验对照, 过表达 *MdLOX1a* 王林愈伤为实验组。称取 5 g 样品, 以三壬酮 (0.4 mg/mL) 为内标, 利用顶空固相微萃取使用 GCMS-QP2010 Plus (SHIMADZU) 气相色谱-质谱联用仪检测香气物质, 对照组与实验组各设置 3 个重复, 初步检测结果使用 NIST17-1、NIST17-2 及 NIST17S 谱库进行检索, 并用面积归一化的方法计算各成分以内标为参照的相对含量, 具体计算方法参照刘静轩等^[11]。

1.6 数据分析

数据处理及制作图表使用 Excel 2010 软件,显著性分析使用 DPS 数据处理系统软件。

2 结果与分析

2.1 *MdLOX1a* 启动子克隆及作用元件分析

以紫红 3 号愈伤 DNA 为模板克隆得到一条大小约 1100 bp 的条带(图 1)。对该条带胶回收测序,获得该基因部分启动子序列 1058 bp,并利用 PlantCARE 数据库对其顺式作用元件进行预测。预测结果显示(表 2),*MdLOX1a* 启动子上有响应 ABA(ABRE)、低温(LTR)、光(G-Box)等顺式作用元件,推测 *MdLOX1a* 响应 ABA、低温与光照等胁迫。

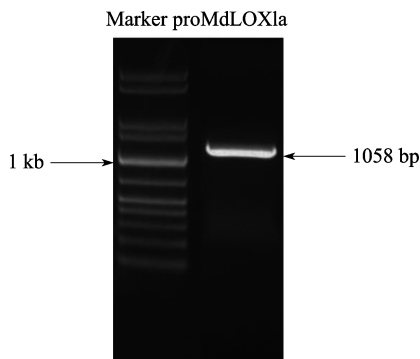


图 1 *MdLOX1a* 启动子扩增
Fig.1 PCR amplification of *MdLOX1a* promoter

表 2 *MdLOX1a* 部分启动子顺式作用元件预测结果
Table 2 Prediction of *cis*-acting elements in *MdLOX1a* partial promoter

顺式作用元件 <i>Cis</i> -acting element	序列 Sequences	功能 Function
ABRE	ACGTG	参与脱落酸反应的顺式作用元件
LTR	CCGAAA	参与低温反应的顺式作用元件
MBS	CAACTG	干旱诱导的 MYB 结合位点
TGACG-motif	TGACG	参与 MEJA 反应的顺式调节元件
O2-site	GATGATGTGG	参与玉米醇溶蛋白代谢调控的顺式调节元件
G-Box	CACGTT	参与光响应的顺式调节元件
Sp1	GGGCGG	光响应元件
GT1-motif	GGTTAA	光响应元件
Chs-Unit 1 ml	ACCTAACCCGC	光响应元件的一部分

2.2 *MdLOX1a* 基因编码区的克隆及生物信息学的分析

以紫红 3 号愈伤 cDNA 为模板,利用 RT-PCR 技术得到一条大小约 2600 bp 的条带(图 2)。对克隆片段进行胶回收测序,发现该基因的开放阅读框长度为 2592 bp,蛋白理化性质分析显示其编码 863 个氨基酸,蛋白质分子质量为 97.69 kD,理论等电点为 5.14。

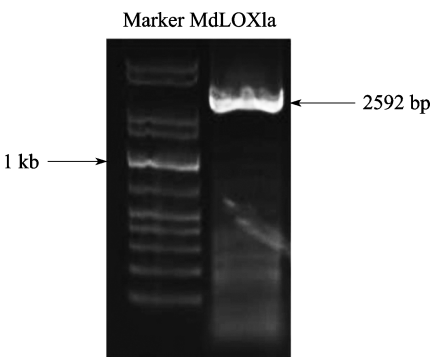


图 2 *MdLOX1a* 编码区全长 RT-PCR 克隆
Fig.2 Full-length RT-PCR isolation of *MdLOX1a* encoding region

2.3 *MdLOX1a* 的基因组结构及进化树分析

利用 NCBI 数据库分析 *MdLOX1a* 基因所在的染色体位置和基因结构。*MdLOX1a* 位于苹果基因组的第 9 号染色体上,由 8 个外显子与 7 个内含子构成(图 3)。对来自不同物种的 LOX 基因构建系统发育进化树(图 4),通过系统进化树分析发现,*MdLOX1a* 与 *MdLOX7a*、*MdLOX2a*、*MdLOX5a* 在不同进化枝上,亲缘关系较远,与 *Pb9S-LOX5* 在同一个进化枝上,两者的亲缘关系最近,表明 *MdLOX1a* 与 *Pb9S-LOX5* 功能相似。

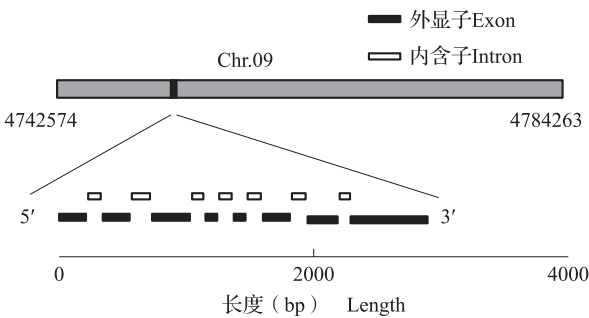
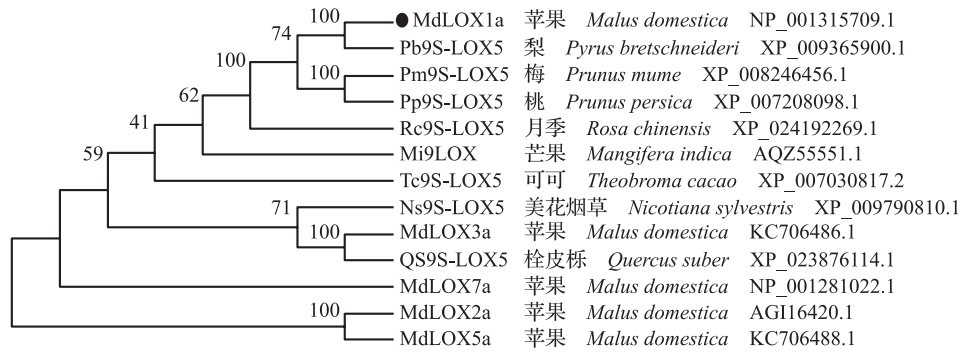


图 3 *MdLOX1a* 基因组结构
Fig.3 Genomic structure of *MdLOX1a*

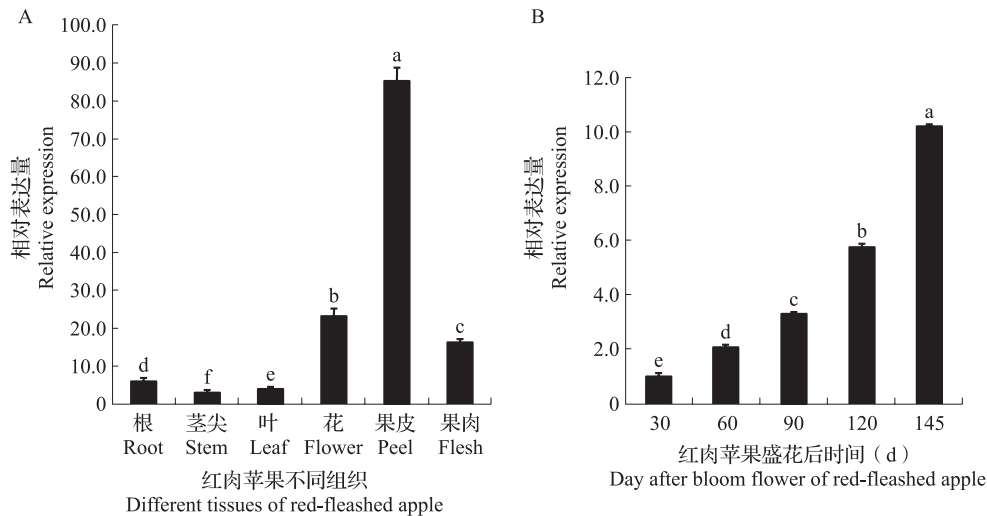
2.4 *MdLOX1a* 基因表达特性分析

对红肉苹果进行时空表达分析,结果显示:*MdLOX1a* 在被检测组织中均表达,且在果皮中的

图4 *MdLOX1a* 系统进化树分析Fig.4 Phylogenetic analysis of *MdLOX1a*

表达水平最高,显著高于在其他组织中的表达;在花和果肉中的表达量次之,在茎尖和叶中的表达量最低,组织特异性显著(图5A)。另外,*MdLOX1a*的表达水平随着果实成熟逐渐上调,在花后145 d

时其表达量最高,显著高于花后30 d、60 d、90 d、120 d(图5B)。因此*MdLOX1a*具有组织表达特异性,并与果实成熟密切相关,但具体作用机理有待进一步研究。



小写字母表示指标间差异显著 ($P < 0.05$), 下同

Lowercase letters indicate significant differences between the indicators ($P < 0.05$), the same as below

图5 *MdLOX1a* 组织表达特异性及发育期表达分析Fig.5 Tissue expression specificity and developmental expression analysis of *MdLOX1a*

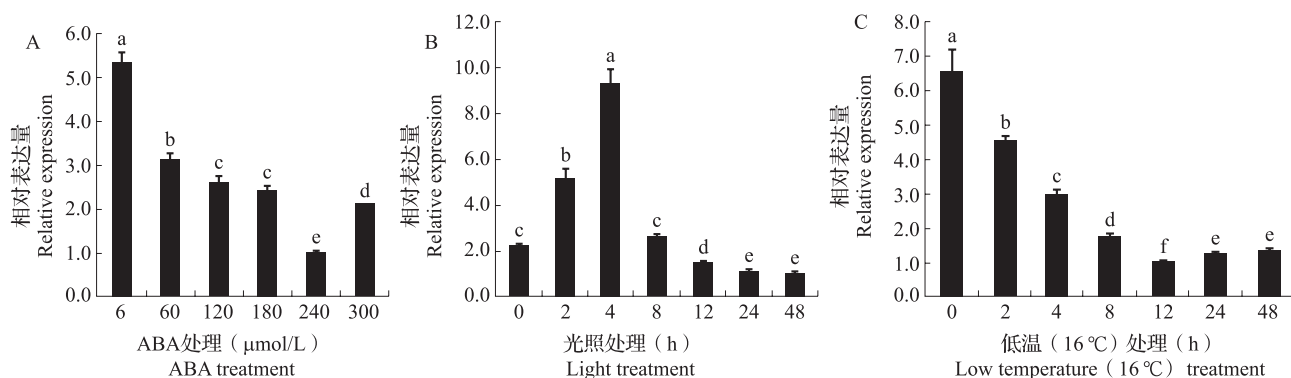
2.5 胁迫条件下 *MdLOX1a* 的表达分析

荧光定量分析发现,经外源ABA与低温处理,*MdLOX1a*与对照相比均显著下调。经ABA处理后,*MdLOX1a*表达水平随ABA浓度的增加先下降后上升,但其表达水平总体仍为下调,其中240 $\mu\text{mol/L}$ ABA处理时*MdLOX1a*表达下调最明显,相比对照下降约4倍(图6A);持续光照处理后,*MdLOX1a*的表达在4 h内急剧上调,4~12 h内迅速下调,而在24 h后转录水平基本保持稳定,整体呈现先上升后下降而后稳定的趋势,不仅如此,持续光照4 h时,*MdLOX1a*的表达水平约为对照处理的5倍(图6B);在低温(16 $^{\circ}\text{C}$)处理过

程中,*MdLOX1a*的表达水平快速下降且缓慢上调并趋于稳定,其中,*MdLOX1a*的表达量在低温处理12 h时达到最低,相较对照下降约6倍,且在12 h后,*MdLOX1a*的表达水平略微上调且趋于稳定(图6C)。因此,*MdLOX1a*可能通过响应不同的生物胁迫与非生物胁迫进而参与苹果脂肪酸代谢的过程。

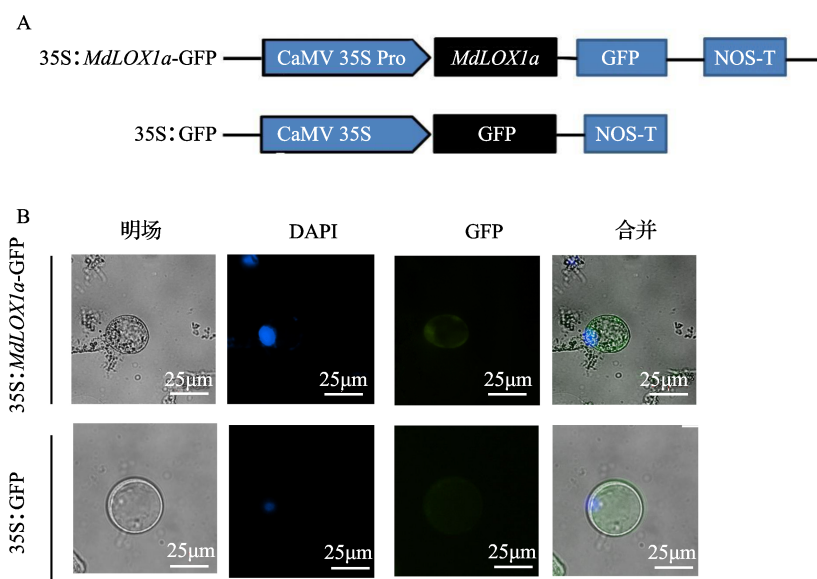
2.6 *MdLOX1a* 蛋白亚细胞定位

将去终止密码子后的*MdLOX1a*编码序列利用 *Sma* I 和 *Kpn* I 双酶切与亚细胞定位载体 pRI101-AN 定向连接,成功构建带有 GFP 标签的 pRI101-*MdLOX1a* 重组质粒。将带有 GFP 标签的

图 6 胁迫条件下红色愈伤组织中 *MdLOX1a* 的表达模式Fig.6 Expression pattern of *MdLOX1a* in red callus under stresses

空 pRI101-AN 载体作为对照 (图 7A)。实验组与对照组融合蛋白分别转化王林原生质体,并使用荧光显微镜观察。检测到实验组不仅在细胞核出现 GFP 绿色荧光,而且在细胞膜中也出现相同荧光,但细胞

质内无 GFP 荧光;对照组中,在细胞内均能观察到 GFP 荧光,DAPI 染色并合并图层后发现,DAPI 蓝光与实验组细胞核位置处的 GFP 绿色荧光重合,表明 *MdLOX1a* 蛋白定位于细胞膜与细胞核上 (图 7B)。

图 7 *MdLOX1a* 蛋白在过表达王林原生质体中定位Fig.7 Localization of *MdLOX1a* protein of protoplasts in overexpressed 'Orin'

2.7 *MdLOX1a* 基因在过表达王林愈伤组织的功能分析

荧光定量结果显示,在过表达 *MdLOX1a* 的王林愈伤组织中,*MdLOX1a* 的表达量是在野生型王林愈伤组织中的 17.6 倍 (图 8A);同时,对二者香气挥发性成分分析发现,与野生王林愈伤相比,过表达 *MdLOX1a* 基因的愈伤组织中醛类物质提高 1.43 倍,酮类物质提高 3.2 倍,醇类物质提高 1.31 倍,酯类物质提高 1.50 倍,过表达 *MdLOX1a* 后香气总挥发性成分较对照均有不同程度增加 (图 8B),此结果表明 *MdLOX1a* 基因促进香气挥发性物质的合成。

3 讨论

前人研究发现 *LOX* 基因具有显著的 PLAT 保守结构域^[26],该结构域存在于各种膜或脂质相关蛋白中,具有防御病原体、调控代谢、介导脂质或与膜结合蛋白的相互作用^[27],*LOX* 蛋白主要存在于叶绿体^[28]、脂质体^[29]、液泡^[30]、质体^[31]等部位。本研究从紫红 3 号愈伤组织中克隆得到 *MdLOX1a* 基因,并转化王林原生质体,经亚细胞定位发现该基因定位于细胞核与细胞膜上,推测该基因在不同部位发挥作用。

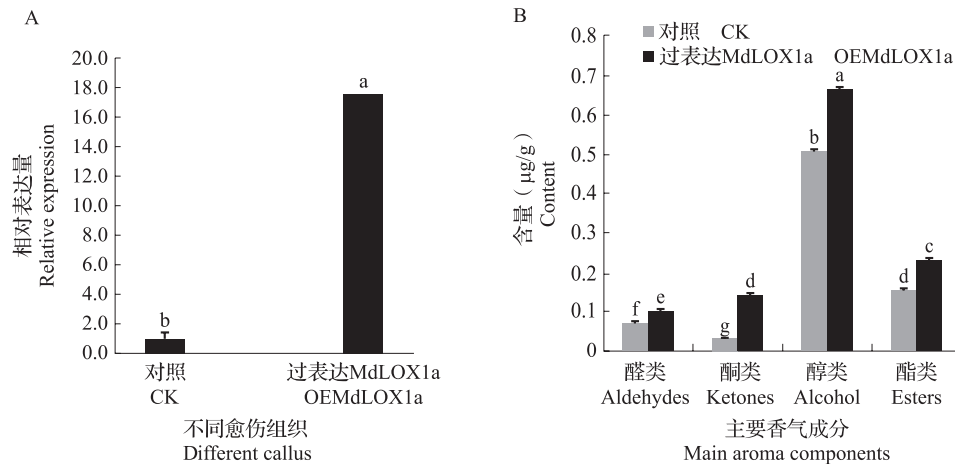


图8 *MdLOX1a* 基因在过表达王林愈伤组织的功能验证
Fig.8 Functional verification of *MdLOX1a* gene in overexpressed 'Orin'

近年来,水果的品质研究逐渐成为热点^[32-33],香气品质作为品质之一被广泛关注,其结构基因的功能也被相继鉴定。在马铃薯^[34]和番茄^[7]研究中,反义转 *LOX* 基因后挥发性物质含量均降低,然而本试验过表达 *MdLOX1a* 基因并转化王林苹果愈伤组织后发现,实验组中总香气物质含量较对照组增多,与汤雨凡^[16]研究结论一致,说明脂氧合酶基因 *MdLOX1a* 对香气物质合成具有促进作用。另外,低温贮藏显著降低了蜜桃的挥发性成分含量^[35],也延缓了苹果香气成分变化^[36],在低温下辣椒 *CmLOX03* 的转录水平下调,富平柿在低温贮藏过程中 *DkLOX3* 同样受到抑制^[9],本研究也得到相同结果, *MdLOX1a* 的表达在低温环境下受到抑制,与此同时在获得的启动子序列中发现存在低温响应元件(LTR)。有报道指出,在刚毛桤柳研究中,鉴定出 LTRE1 为 *ThbHLH1* 在启动子上的结合位点之一^[37],大麦 *HvCBF1* 通过与基因启动子上 LTR 元件结合调控低温应答^[38]。此结论在苹果花青苷合成方面也有报道,响应低温的转录因子 *MdbHLH3* 与花青苷合成的结构基因 *MdUFGT* 启动子上的 LTR 元件结合^[39],促进低温下花青苷积累,最近的报道同样指出 *MdbHLH3* 与 *MdbBX20* 启动子上的 LTR 元件结合促进花青苷合成^[40]。基于以上研究结论,推测香气物质合成途径中也存在类似的调控机制,相关研究在苹果脂氧合酶基因调控果实香气物质合成方面未见报道,这将成为后期主要研究目标,为阐明低温延长苹果香气品质提供初步理论依据,也为深入研究 *MdLOX1a* 在果实品质形成中的功能奠定基础。

参考文献

- [1] 张群. 脂肪氧合酶的研究. 食品与生物技术学报, 2013, 32 (7): 784
Zhang Q. The study of lipoxygenase. Journal of Food Science and Biotechnology, 2013, 32 (7): 784
- [2] Yenofsky R L, Fine M, Liu C. Isolation and characterization of a soybean (*Glycine max*) lipoxygenase-3 gene. Molecular and General Genetics, 1988, 211 (2): 215-222
- [3] Yang X Y, Jiang W J, Yu H J. The expression profiling of the Lipoxygenase (LOX) family genes during fruit development, abiotic stress and hormonal treatments in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13 (12): 2481-2500
- [4] Zhang C, Jin Y, Liu J, Tang Y, Cao S, Qi H. The phylogeny and expression profiles of the lipoxygenase (LOX) family genes in the melon (*Cucumis melo* L.) genome. Scientia Horticulturae, 2014, 170: 94-102
- [5] Zhang B, Chen K, Bowen J, Allan A, Espley R, Karunairatnam S, Ferguson I. Differential expression within the LOX gene family in ripening kiwifruit. Journal of Experimental Botany, 2006, 57 (14): 3825-3836
- [6] Zhang B, Yin X R, Li X, Yang S L, Lan B F, Chen K S. Lipoxygenase gene expression in ripening kiwifruit in relation to ethylene and aroma production. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57 (7): 2875-2881
- [7] Chen G. Identification of a specific isoform of tomato lipoxygenase (*TomloxC*) involved in the generation of fatty acid-derived flavor compounds. Plant Physiology, 2004, 136 (1): 2641-2651
- [8] 申济源. 基于 LOX 途径的果实香气物质形成与调控解析. 杭州: 浙江大学, 2013
Shen J Y. Analysis of fruit aroma substance formation and regulation based on LOX pathway. Hangzhou: Zhejiang University, 2013
- [9] 孟坤. 柿脂氧合酶及其相关基因与果实成熟软化的关系研究. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016
Meng K. Study on the relationship between persimmon lipoxygenase and its related genes and fruit ripening and softening. Yangling: Northwest A & F University, 2016

- [10] 孙婷婷, 王文举, 姜文月, 刘峰, 张旭, 王玲, 陈玉凤, 阙友雄, 许莉萍, 李大妹, 苏亚春. 甘蔗脂氧合酶基因 *ScLOX1* 的克隆与表达分析. 作物学报, 2019, 45 (7): 1002-1016
Sun T T, Wang W J, Lou W Y, Liu F, Zhang X, Wang L, Chen Y F, Que Y X, Xu L P, Li D M, Su Y C. Cloning and expression analysis of lipoxygenase gene *ScLOX1* from sugarcane. Acta Agronomica Sinica, 2019, 45 (7): 1002-1016
- [11] 刘静轩, 许海峰, 王得云, 张宗营, 王意程, 左卫芳, 王楠, 姜生辉, 毛志泉, 陈学森. 两个耐贮性不同的红肉苹果株系果实硬度与香气成分及相关酶活性与基因表达差异分析. 园艺学报, 2017, 44 (2): 330-342
Liu J X, Xu H F, Wang D Y, Zhang Z Y, Wang Y C, Zuo W F, Wang N, Jiang S H, Mao Z Q, Chen X S. Analysis of fruit firmness, aroma components, related enzyme activities and gene expression of two red meat apple lines with different storage tolerance. Acta Horticulture Sinica, 2017, 44 (2): 330-342
- [12] 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. 农业生物技术学报, 2012, 20 (10): 1126-1134
Jia Q L, Gong Z H, Li D W. Cloning and expression analysis of 13-lipoxygenase gene (*CaLOX2*) in chloroplast by *capsicum annua* L.. Journal of Agricultural Biotechnology, 2012, 20 (10): 1126-1134
- [13] 侯赛男, 邹同雷, 汪芳俊, 孙雪, 徐年军. 茉莉酸甲酯和水杨酸对坛紫菜生长与抗逆性的影响. 海洋科学, 2017, 41 (1): 104-112
Hou S N, Zou T L, Wang F J, Sun X, Xu N J. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the growth and stress resistance of *Porphyra haitanensis*. Marine Science, 2017, 41 (1): 104-112
- [14] Allmann S, Halitschke R, Schuurink R C, Baldwin I T. Oxylipin channelling in *Nicotiana attenuata*: lipoxygenase 2 supplies substrates for green leaf volatile production. Plant, Cell & Environment, 2010, 33 (12): 2028-2040
- [15] Zhang B, Shen J Y, Wei W W. Expression of genes associated with aroma formation derived from the fatty acid pathway during peach fruit ripening. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58 (10): 6157-6165
- [16] 汤雨凡. 脂氧合酶在薄皮甜瓜香气物质合成中的作用. 沈阳: 沈阳农业大学, 2017
Tang Y F. The role of lipoxygenase in the synthesis of aroma substances in muskmelon. Shenyang: Shenyang Agriculture University, 2017
- [17] Vogt J, Schiller D, Ulrich D, Schwab W, Dunemann F. Identification of lipoxygenase (LOX) genes putatively involved in fruit flavour formation in apple (*Malus × domestica*). Tree Genetics & Genomes, 2013, 9 (6): 1493-1511
- [18] Duan N, Bai Y, Sun H, Wang N, Ma Y, Li M J, Wang X, Chen J, Legall N, Mao L Y, Wan S B, Wang K, He T M, Feng S Q, Zhang Z Y, Mao Z Q, Shen X, Chen X L, Jiang Y M, Wu S J, Yin C M, Ge S F, Chen X S. Genome re-sequencing reveals the history of apple and supports a two-stage model for fruit enlargement. Nature Communications, 2017, 8 (1): 1-11
- [19] Zhang C, Chen X, He T, Liu X L, Feng T, Yuan Z H. Genetic structure of *Malus sieversii* population from Xinjiang, China, revealed by SSR markers. Journal of Genetics and Genomics, 2007, 34 (10): 947-955
- [20] 张艳敏, 冯涛, 张春雨, 何天明, 张小燕, 刘遵春, 王艳玲, 束怀瑞, 陈学森. 新疆野苹果研究进展. 园艺学报, 2009, 36 (3): 447-452
Zhang Y M, Feng T, Zhang C Y, He T M, Zhang X Y, Liu Z C, Wang Y L, Shu H R, Chen X S. Progress in Xinjiang wild apple research. Acta Horticulturae Sinica, 2009, 36 (3): 447-452
- [21] 王楠, 刘文军, 王意程, 许海峰, 房鸿成, 杨官显, 吴树敬, 张宗营, 陈学森. 高类黄酮苹果新品种 ‘美红’. 园艺学报, 2018, 45 (S2): 2705-2706.
Wang N, Liu W J, Wang Y C, Xu H F, Fang H C, Yang G X, Wu S J, Zhang Z Y, Chen X S. A new high-flavonoid apple cultivar ‘meihong’. Acta Horticulturae Sinica, 2018, 45 (S2): 2705-2706
- [22] 王意程, 王楠, 许海峰, 张宗营, 姜生辉, 房鸿成, 张静, 苏梦雨, 许琳, 陈学森. 红肉苹果冷信号基因 *MdICE1* 的表达及其蛋白与 MdMYB 的互作. 园艺学报, 2018, 45 (5): 7-16
Wang Y C, Wang N, Xu H F, Zhang Z Y, Jiang S H, Fang H C, Zhang J, Su M Y, Xu L, Chen X S. The expression of the cold signal gene *MdICE1* of the red meat and its interaction with MdMYB. Acta Horticulturae Sinica, 2018, 45 (5): 7-16
- [23] Wang N, Xu H, Jiang S, Zhang Z, Lu N, Qiu H, Qu C, Wang Y, Wu S, Chen X. MYB12 and MYB22 play essential roles in proanthocyanidin and flavonol synthesis in red-fleshed apple (*Malus sieversii* f. *niedzwetzkyana*). Plant Journal for Cell & Molecular Biology, 2017, 90 (2): 276-292
- [24] Kenneth J L, Thomas D S. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 2001, 25 (4): 402-408
- [25] Xu H, Wang N, Liu J, Qu C Z, Wang Y C, Jiang S H, Lu N L, Wang D Y, Zhang Z Y, Chen X S. The molecular mechanism underlying anthocyanin metabolism in apple using the MdMYB16 and MdbHLH33 genes. Plant Molecular Biology, 2017, 94 (1-2): 149-165
- [26] Suzuki M. Endogenous alpha-Ketol linolenic acid levels in short day-induced cotyledons are closely related to flower induction in *Pharbitis nil*. Plant Cell Physiology, 2003, 44 (1): 35-43
- [27] Oliu E H. Plant and fungal lipoxygenases. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002, 68: 313-323
- [28] Farmaki T, Sanmartín M, Jiménez P, Paneque M, Sanz C, Vancanneyt G, León J, Sánchez-S J J. Differential distribution of the lipoxygenase pathway enzymes within potato chloroplasts. Journal of Experimental Botany, 2007, 58 (3): 555-568
- [29] Bell E, Creelman R A, Mullet J E. A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995, 92 (19): 8675-8679
- [30] Tranbarger T J. The soybean 94-kilodalton vegetative storage protein is a lipoxygenase that is localized in paraveinal mesophyll cell vacuoles. Plant Cell, 1991, 3 (9): 973-987
- [31] Todd J F, Paliyath G, Thompson J E. Characteristics of a membrane-associated lipoxygenase in tomato fruit. Plant

- Physiology, 1990, 94(3): 1225-1232
- [32] 陈学森, 王楠, 张宗营, 冯守千, 陈晓流, 毛志泉. 仁果类果树资源育种研究进展 I: 我国梨种质资源、品质发育及遗传育种研究进展. 植物遗传资源学报, 2019, 20(4): 791-800
Chen X S, Wang N, Zhang Z Y, Feng S Q, Chen X L, Mao Z Q. Research progress on breeding of prunus fruit tree resources I: Research progress on pear germplasm resources, quality development and genetic breeding in China. Journal of Plant Genetic Resources, 2019, 20(4): 791-800
- [33] 王楠, 张静, 于蕾, 邹琦, 郭章文, 毛作霖, 王意程, 姜生辉, 房鸿成, 许海峰, 苏梦雨, 张宗营, 冯守千, 陈晓流, 王志刚, 姜召涛, 东明学, 徐月华, 李建明, 毛志泉, 陈学森. 仁果类果树资源育种研究进展 II: 苹果种质资源、品质发育及遗传育种研究进展. 植物遗传资源学报, 2019, 20(4): 801-812
Wang N, Zhang J, Yu L, Zou Q, Guo Z W, Mao Z L, Wang Y C, Jiang S H, Fang H C, Xu H F, Su M Y, Zhang Z Y, Feng S Q, Chen X L, Wang Z G, Jiang S T, Dong M X, Xu Y H, Li J M, Mao Z Q, Chen X S. Research progress on breeding of prunus fruit tree resources II: Research advances in apple germplasm resources, quality development and genetic breeding. Journal of Plant Genetic Resources, 2019, 20(4): 801-812
- [34] Salas J J, Sánchez C, García-González D L, Diego L, Aparicio R. Impact of the suppression of lipoxygenase and hydroperoxide lyase on the quality of the green odor in green leaves. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(5): 1648-1655
- [35] Zhang B, Xi W P, Wei W W, Shen J Y, Chen K S. Changes in aroma-related volatiles and gene expression during low temperature storage and subsequent shelf-life of peach fruit. Postharvest Biology & Technology, 2011, 60(1): 7-16
- [36] 许宝峰, 张鹤, 李成, 孙建设, 郝建柱, 卞兰春. 冷藏对“王林”苹果香气成分的影响. 北方园艺, 2014(22): 132-136
Xu B F, Zhang H, Li C, Sun J S, Hao J Z, Mu L C. Effect of cold storage on aroma components of ‘Orin’ apple. Northern Horticulture, 2014(22): 132-136
- [37] 及晓宇, 李子义, 卢慧君, 聂显光, 王玉成. 刚毛桤柳 *TbHHLH1* 转录因子识别的顺式作用元件的鉴定. 林业科学研究, 2018, 31(5): 42-49
Ji X Y, Li Z Y, Lu H J, Nie X G, Wang Y C. Identification of the homeopathy elements identified by the *TbHHLH1* transcription factor of the bristles. Forest Scientific Research, 2018, 31(5): 42-49
- [38] Xue G P. An AP2 domain transcription factor *HvCBF1* activate expression of cold-responsive genes in barley through interaction with a (G/a)(C/t)CGAC motif. Biochimica et Biophysica Acta, 2002, 1577(1): 63-72
- [39] Xie X B, Shen L I, Zhang R F, Zhao J, Chen Y C, Zhao Q, Yao Y X, You C X, Zhang X S, Hao Y J. The *bHLH* transcription factor *MdbHLH3* promotes anthocyanin accumulation and fruit colouration in response to low temperature in apples. Plant, Cell & Environment, 2012, 35(11): 1884-1897
- [40] Fang H, Dong Y, Yue X X, Hu J F, Jiang S H, Xu H F, Wang Y C, Su M Y, Zhang J, Zhang Z Z, Wang N, Chen X S. The B-box zinc finger protein *MdbBX20* integrates anthocyanin accumulation in response to ultraviolet radiation and low temperature. Plant, Cell & Environment, 2019, 42(7): 2090-2104