

唐菖蒲茉莉酸生物合成关键酶基因 *LOX1* 的克隆及表达分析

连青龙, 辛海波, 张自由, 钟雄辉, 罗 弦, 义鸣放*

(中国农业大学观赏园艺与园林系, 北京 100193)

摘 要: 以唐菖蒲 (*Gladiolus hybridus*) 品种 ‘Rose Supreme’ 的球茎为试材, 通过 RT-PCR 和 RACE 技术克隆到了一个全长为 2 797 bp 的茉莉酸 (Jasmonic acid, JA) 生物合成关键酶 LOX 基因的 cDNA 序列, 命名为 *GhLOX1*, 属于 9-LOX。该序列含有一个 2 541 bp 的开放阅读框 (ORF), 编码 846 个氨基酸, 推导的蛋白质分子量为 94.90 kD。RT-PCR 表达分析表明, 该基因在唐菖蒲叶、花、根、匍匐茎、新球茎和籽球上都表达, 而在叶和匍匐茎中表达量最高, 在花和籽球中表达量较低; 离体条件下, 经过 0、0.1、0.5、1.0、2.0 mmol · L⁻¹ 的不同浓度梯度的水杨酸 (SA) 处理后, 其表达水平随着浓度的升高而降低, 当 SA 浓度达到 2.0 mmol · L⁻¹ 时没有表达。

关键词: 唐菖蒲; LOX; JA; 克隆; 表达

中图分类号: S 682.2

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 03-0563-08

Cloning and Expression Analysis of Lipxygenase-1 Gene Encoding a Key Enzyme of the Biosynthesis of Jasmonic Acid from *Gladiolus hybridus*

LIAN Qing-long, XIN Hai-bo, ZHANG Zi-you, ZHONG Xiong-hui, LUO Xian, and YI Ming-fang*

(Department of Ornamental Horticulture and Landscape Architecture, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: A full length cDNA named *GhLOX1* belonging to 9-LOX was cloned in *Gladiolus hybridus* ‘Rose Supreme’ corms by RT-PCR and RACE. The open reading frame encompassed 2 541 bp encoding a polypeptide of 846 amino acids with calculated protein molecular mass of 94.90 kD. RT-PCR analysis showed that *GhLOX1* gene was expressed in leaf, flower, root, stolon, corm, cormel, and higher in the leaf and stolon. *In vitro*, with the different concentration of salicylic acid (SA) 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mmol · L⁻¹ treatment respectively, the expression level decreased as the concentration increased. *LOX1* wasn’t expressed after treating 2.0 mmol · L⁻¹ SA.

Key words: *Gladiolus hybridus*; lipxygenase; jasmonic acid; cloning; expression

茉莉酸及其茉莉酸类化合物 (JAs) 是由脂氧合酶途径, 经过 LOX 和 AOS 等一系列的酶促反应形成的。LOX 作为茉莉酸类化合物 (茉莉酸及其衍生物) 生物合成途径中的关键酶, 在 JAs 生物合成途径中起着重要作用, 故可通过调控 LOX 活性来控制 JAs 的生物合成, 从而调节植物的许多生理过程 (Feussner et al., 2001)。

收稿日期: 2010-08-11; 修回日期: 2011-01-11

基金项目: 农业部行业科技项目 (200903020)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: ymfang@cau.edu.cn)

JAs 对离体马铃薯、薯蓣、菊芋的块茎形成和甘薯的块根以及大蒜、洋葱的鳞茎形成具有显著的促进效应,已经从这些材料的叶片中分离出 JA (甘立军 等, 2001)。而 LOX 作为 JAs 生物合成的关键酶,可能同样参与了植物地下变态器官的形成过程 (Fujino et al., 1995; Feussner et al., 2001)。

LOX 在植物体中主要以 LOX1, LOX2 和 LOX3 等 3 种同工酶的类型存在,其中 LOX1 在块茎和根中特异性表达 (Royo et al., 1996; Kolomiets et al., 2001)。Kolomiets 等 (2001) 发现 LOX 的转录与匍匐茎的形成以及块茎的发生、发展等密切相关。LOX 活性被抑制可能导致块茎体积变小、形成受阻以及产量减少。*POTLX-1* 是马铃薯中具有块茎专一性表达的 LOX 基因,其编码产物具有 9-LOX 的活性,原位杂交也证实其主要在发育的块茎中表达,而转反义基因的马铃薯植株,其块茎的体积和质量都明显下降,形状也发生了畸形的变化 (Feussner et al., 2001)。

本课题组前期的研究发现,在离体条件下,经过 MJ 处理后唐菖蒲的结球率、球茎鲜样质量和直径明显升高,促进了球茎的形成和膨大,并且显著提高了 JA 生物合成关键酶 LOX 的活性;而经 LOX 抑制剂水杨苷异羟肟酸 (Salicylhydroxamic acid, SHAM) 处理后,其结球时间明显推迟,结球率、球茎鲜质量和直径等指标明显下调,并且 LOX1 活性和 MJ 含量也显著降低 (何秀丽, 2008a, 2008b; He et al., 2008)。作为唐菖蒲茉莉酸生物合成的关键酶——LOX 催化茉莉酸生物合成途径中的反应底物亚油酸和亚麻酸,对茉莉酸及其化合物的合成起到了促进的作用。本研究中克隆了唐菖蒲茉莉酸生物合成关键酶基因 *LOX1* 的全长 cDNA 序列,并对其表达状况进行了初步的分析,旨在为该基因调控唐菖蒲茉莉酸及其化合物的生物合成,进而探讨 *LOX1* 在唐菖蒲球茎形成过程中的生理功能提供依据,并为进一步深入研究 *LOX1* 基因的功能及其调控提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

唐菖蒲 ‘Rose Supreme’ 品种的种球购自辽宁省金城园艺试验场,周径为 10 ~ 12 cm, 2009 年 4 月初种植在中国农业大学科学园。组培球茎是以 2008 年大田收获的籽球为外植体培养而成,收获的籽球在 4 °C 冰箱中贮存。*LOX1* 基因的分离是以组培球茎为材料,RT-PCR 表达分析用的叶、根、新球为组培苗,花为 2009 年 7 月中旬在大田中采得,匍匐茎和籽球为 2009 年 8 月中旬在大田中采得。

1.2 RNA 的提取及逆转录反应

唐菖蒲新球和籽球 RNA 的分离采用 MyLab 通用型 RNA 快速提取试剂盒;叶片、花和根采用百泰克 RNAPure 高纯总 RNA 快速提取试剂盒;匍匐茎采用北京强欣博瑞生物技术有限公司生产的 EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒。DEPC 水溶解 RNA,用分光光度计测定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 数值,根据 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值判断 RNA 的质量,用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

cDNA 反转录按照 Promega 的 M-MLV Reverse Transcriptase 说明书进行。*LOX1* 5'端 cDNA 合成按照 TaKaRa 公司的 5'-Full RACE Kit 试剂盒说明书进行。

1.3 唐菖蒲 LOX1 保守片段的克隆

根据 GenBank 核酸数据库中报道的拟南芥 (NM_104376.2)、烟草 (X84040.1)、山茶 (EU195885.2)、马铃薯 (X79107.1)、棉花 (AF361893.4) 等 *LOX1* 基因的 mRNA 序列,通过 DNAMAN 软件进行同源比对并设计保守区兼并引物,并根据已获得的片段序列设计特异引物,引物序列见表 1。片段 A1 由引物 PF1 和 PR1 扩增得到,反应程序为: 94 °C, 4 min; 94 °C, 45 s; 50 °C, 45 s; 72 °C, 60 s; 5 个循环; 94 °C, 45 s; 52 °C, 45 s; 72 °C, 60 s; 30 个循环; 72 °C, 10 min。片

段 A2 由引物 PF2 和 PR2 扩增得到, 反应程序为: 94 °C, 4 min; 94 °C, 45 s; 47 °C, 45 s; 72 °C, 90 s; 5 个循环; 94 °C, 45 s; 50 °C, 45 s; 72 °C, 90 s; 30 个循环; 72 °C, 10 min。片段 A3 由引物 PF3 和 PR3 扩增得到, 反应程序为: 94 °C, 4 min; 94 °C, 45 s; 50 °C, 45 s; 72 °C, 60 s; 5 个循环; 94 °C, 45 s; 52 °C, 45 s; 72 °C, 60 s, 30 个循环; 72 °C, 10 min。片段 A4 由引物 PF3 和 PR4 扩增得到, 反应程序为: 94 °C, 4 min; 94 °C, 45 s; 47 °C, 45 s; 72 °C, 90 s; 5 个循环; 94 °C, 45 s; 50 °C, 45 s; 72 °C, 90 s; 30 个循环; 72 °C, 10 min。

表 1 逆转录和 PCR 引物

Table 1 Primers applied in the reverse transcription and PCR

引物 Primers	序列 Sequence	引物 Primers	序列 Sequence
PF1	GAACAGGCACAAAGCAACAA	PR5	GCAACGGAAACTTGAGGAG
PF2	TGGGAYAGDGTHTATGACTATG	PR6	ATTGATGGGAGGAGTCATGG
PF3	CATTCGTGATGCAACAAACC	PR7	AGTAGGGAGTGCCTGTTCATA
PF4	GCTTCGCCTACTGATCAAGG	PR8	CGCGTCGACGACCAGGGCTTTAGTTTAGATGG
PF5	AGACCAATCCGGACAAAGTG	AP1	CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGC
PF6	TGCTTGGGAAGACAGATGAAGAA	AP2	CCAGTGAGCAGAGTGACG
PF7	AATCCCGGGGTAAAATGGGAGAGGGAGATGT	AP3	GAGGACTCGAGCTCAAGC
PR1	GTYTGCADYAADGGCCACCA	<i>actin</i> For	GCT ATT CTT CGT ATC GAC CTT G
PR2	TATTGGATTACCACGACGC	<i>actin</i> Rev	AAC ATT GTG CTC AGC GGT GG
PR3	TCHTCVACNGCHAYNCCTCT	5'RACE	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA
PR4	GGTTTGTTCATCACGAATG	5'RACE	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG

1.4 唐菖蒲 *LOXI* 基因 3'端与 5'端的克隆

对于基因 3'端序列克隆, 根据已克隆的唐菖蒲 *LOXI* 保守片段设计两条 3' RACE 上游引物 PF4 和 PF5, 以 AP1 为逆转录引物进行反转录, 然后以反转录的 cDNA 为模板进行巢式 PCR 扩增。第 1 轮 PCR 反应引物用 PF4 和接头引物 AP2, 94 °C, 4 min; 94 °C, 45 s; 52 °C, 45 s; 72 °C, 70 s; 35 个循环; 72 °C, 10 min。取第 1 轮产物 1 μL 进行第 1 轮反应, 引物为 PF5 和接头引物 AP3。94 °C, 4 min; 94 °C, 45 s; 52 °C, 45 s; 72 °C, 1 min; 35 个循环; 72 °C, 10 min。

对于基因 5' 序列信息的获取按照 TaKaRa 公司的 5'-Full RACE Kit 试剂盒说明书进行, 采用 Random 9 mers 引物进行反转录, 然后以反转录的 cDNA 为模板进行巢式 PCR 扩增。第 1 轮 PCR 反应引物用 5'RACE Outer primer 和特异引物 PR5, 94 °C, 3 min; 94 °C, 30 s; 52 °C, 30 s; 72 °C, 70 s; 35 个循环; 72 °C, 10 min。取第 1 轮产物 1 μL 进行第 2 轮反应, 引物为 5' RACE Inner primer 和特异引物 PR6。94 °C, 3 min; 94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 70 s; 35 个循环; 72 °C, 10 min。

1.5 唐菖蒲 *LOXI* 基因全长的克隆及序列测定

应用 DNAMAN 对 *LOXI* 基因的 3' 端和 5' 端序列进行拼接, 并在 NCBI 网站上预测其 ORF。根据 ORF 两端序列设计特异引物 PF7 和 PR8 扩增该基因的编码区序列 (CDs), 并在上游引物 5' 端和下游引物 3' 端分别设计 *Sma* I 和 *Sal* I 限制性内切酶酶切位点。PCR 反应程序为: 94 °C, 4 min; 94 °C, 45 s; 55 °C, 45 s; 72 °C, 3 min; 35 个循环; 72 °C, 10 min。将所有 PCR 产物凝胶电泳后回收目的片段, 与 PMD18-T 载体连接并转化 DH5α, 重组质粒鉴定后送北京华大基因公司进行测序。

1.6 RT-PCR 的表达分析

采用半定量 RT-PCR 方法研究 *LOXI* 在叶、花、根、匍匐茎、新球茎和籽球不同组织器官的表达模式, 以及组培新球茎在 0、0.1、0.5、1.0、2.0 mmol · L⁻¹ 水杨酸 (SA) 溶液处理后的表达情况。

以 *actin* 基因作为内参, 调整不同处理的模板用量, 使模板用量尽可能一致。用基因特异引物 PF6 和 PR7, 在固定模板量的情况下进行 PCR 反应, 检测基因的相对表达量。*actin* 退火温度 55 °C, 25 个循环, *LOX1* 退火温度 55 °C, 30 个循环。每组处理重复 3 次, 用凝胶成像软件量化图片中 PCR 产物, 文中显示具有代表性的一组电泳图片。

2 结果与分析

2.1 唐菖蒲脂氧合酶 *LOX1* 基因全长 cDNA 序列的克隆

以唐菖蒲组培球茎提取 RNA 逆转录的 cDNA 为模板, 相应的引物和程序进行保守区 PCR 扩增, 得到 4 个 *LOX1* 基因片段, 其核苷酸序列大小分别为 827、704、773 和 1 011 bp (图 1, A1~A4)。

利用两条 3' RACE 上游引物 PF4 和 PF5 进行两轮 PCR 扩增, 测序结果表明该 3' RACE 产物为 541 bp (图 1, B)。结合保守区片段设计两条下游引物, 采用 Random 9 mers 引物进行逆转录, PR5 和 PR6 分别进行 5' 端第 1 轮和第 2 轮 PCR 扩增, 经测序该 5' 端核苷酸序列为 985 bp (图 1, C)。

使用 DNAMAN 把中间片段序列、3'端以及 5'端序列进行拼接, 得到全长 2 797 bp 的全长 *LOX1* 基因序列, 预测其 ORF, 并设计上下游引物 PF7 和 PR8 PCR 扩增该基因的编码区序列, 得到 *LOX1* 基因的 CDS 2 541 bp (图 1, D)。

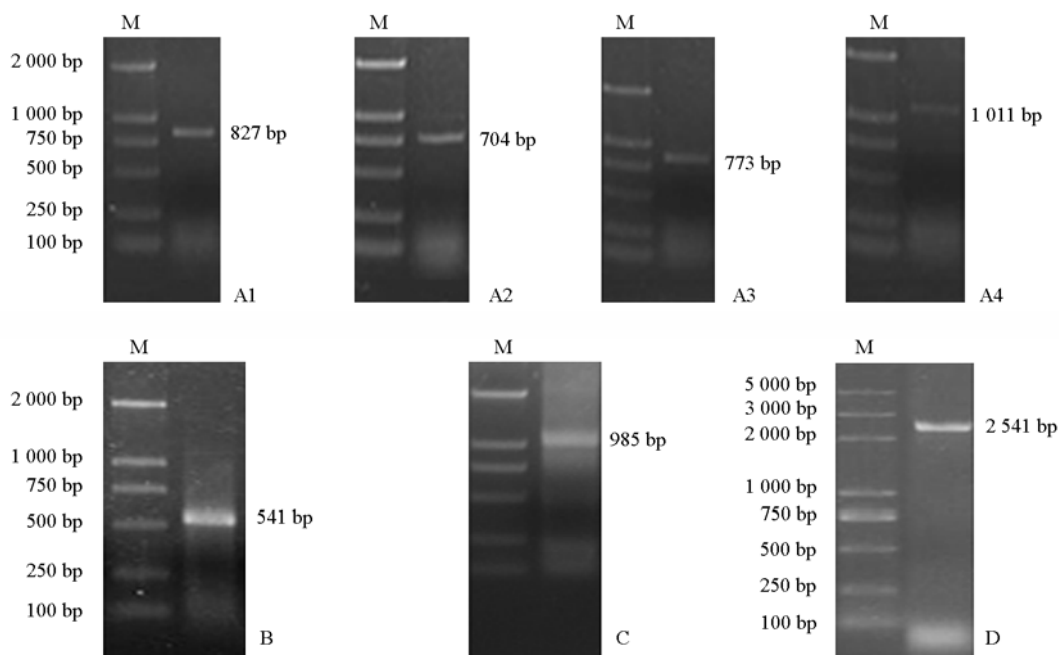


图 1 PCR 产物检测

A1~A4: 中间片段产物; B: 3' RACE 产物; C: 5' RACE 产物; D: CDS 产物; M: DL2000 (plus) marker。

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products

A1 - A4, B, C and D show fragment, 3', 5' and CDS product respectively. M: DL2000 (plus) marker.

2.2 唐菖蒲 *LOX1* 序列分析

对唐菖蒲 *LOX1* 基因的全长序列进行分析得知, 该基因全长 2 797 bp, 包含一个编码 846 个氨基酸的开放阅读框 2 541 bp, 3' utr 和 5' utr 分别为 70 bp 和 186 bp。将编码区核苷酸序列提交 NCBI 在线比对 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 将同源性较高和研究相对较多的项目序列下载,

使用 DNAMAN 将唐菖蒲 *LOX1* 核酸序列与这些序列进行比对。结果表明唐菖蒲 *LOX1* 与山茶 *LOX1* 的同源性最高, 达到 63.8%, 其次为棉花和拟南芥, 分别为 63.6% 和 63.0%, 与研究较多的烟草和马铃薯分别为 62.3% 和 60.1%。

从系统进化树(图 2)与氨基酸序列同源性比较图谱(图 3)可以看出, 推定的唐菖蒲与山茶的 *LOX1* 同源性最高为 62.6%, 其次为棉花和烟草, 分别为 61.9% 和 61.1%; 而与拟南芥和马铃薯的分别为 60.7% 和 60.1%。推导的 *LOX1* 氨基酸序列中(图 3), ‘I、II、III’ 区是 *LOX* 的重要特征区域(Siedow, 1991); ‘+’ 是 3 个区域中完全保守的氨基酸; ‘▼’ 是 5 个植物 *LOX* 高度保守的组氨酸(Steczko et al., 1992); ‘0’ 是结合铁离子所需的组氨酸; II 区中决定 9-*LOX* 属性的缬氨酸位于第 564 位。

经过 NCBI blast 比对发现, 该基因序列与具有 9-*LOX* 活性的 *LOX1* 同源性较高。系统进化树分析也表明, 该基因与山茶、棉花、烟草、拟南芥和烟草的 *LOX1* 亲缘关系较近。结合核酸序列比对结果, 本试验中克隆到的基因序列确定为唐菖蒲 *LOX1* 基因序列, 将其命名为 *GhLOX1*。利用 ExPASyD 分析唐菖蒲 *GhLOX1* 基因, 推导的蛋白质分子量为 94.90 kD, 等电点 4.87。

2.3 唐菖蒲 *LOX1* 在不同组织的 RT-PCR 表达分析

采用 RT-PCR 法, 对唐菖蒲的叶、花、根、匍匐茎、新球茎、籽球进行相对定量表达分析。从图 4 可以看出, 在内参 *actin* 扩增产物比较一致的情况下, *LOX1* 在叶、花、根、匍匐茎、新球茎、籽球组织里都有表达, 其中在匍匐茎和叶中的表达量最高, 而在花和籽球中表达量较低。

2.4 唐菖蒲 *LOX1* 在不同水杨酸浓度处理下组培球茎的 RT-PCR 表达分析

从图 5 可以看出, 在不同浓度的 SA 后, 随着 SA 处理浓度的增加, *LOX1* 在唐菖蒲组培球茎的表达量随之减少, 在未经过 SA 处理的唐菖蒲组培球茎中 *LOX1* 的表达量最高, 而经过浓度为 0.1 mmol · L⁻¹ 的 SA 处理后 *LOX1* 的表达量最低, 当 SA 浓度达到 2.0 mmol · L⁻¹ 时 *LOX1* 基本不在球茎中表达。

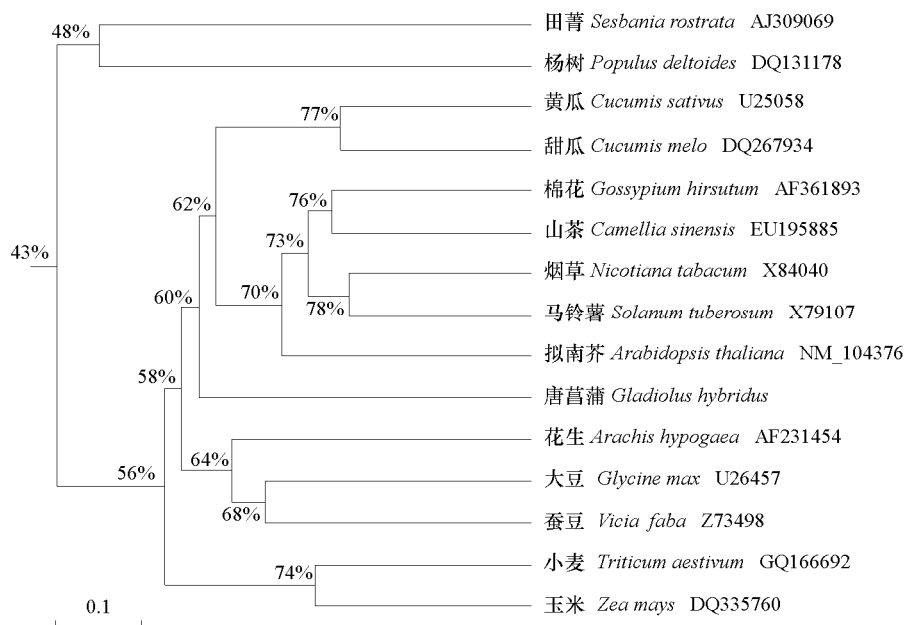


图 2 *LOX1* 与几种植物蛋白氨基酸同源序列的聚类分析

Fig. 2 Clustering of the deduced amino acid sequences of *LOX1* with homologous amino acid sequences among *Gladiolus hybridus* and other plants

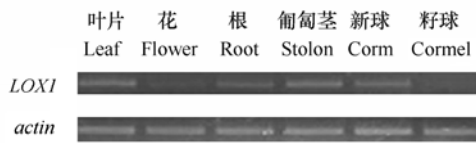


图4 唐菖蒲 *LOX1* 在不同组织的表达
Fig. 4 *Gladiolus hybridus* *LOX1* expression in various tissues

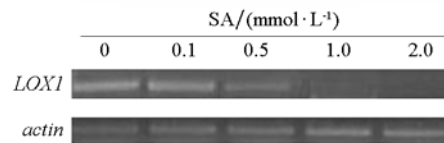


图5 唐菖蒲球茎在不同 SA 浓度处理下 *LOX1* 的表达
Fig. 5 *LOX1* expression in the corms of *Gladiolus hybridus* with different concentration of SA

3 讨论

通过 *GhLOX1* 与 4 个植物物种的 *LOX1* 氨基酸序列同源比对分析,发现 *GhLOX1* 包含植物 LOX 的保守区域,并且在 *GhLOX1* 第 501~538 位置上氨基酸的区域发现了 5 个高度保守的组氨酸(图 3, I)。另外还发现,在 *GhLOX1* 的 501, 511 和 698 氨基酸的位置上具有结合铁离子所需的组氨酸(图 3, I、II) (Steczko et al., 1992), 并且在 *GhLOX1* 的 C 末端氨基酸与其他植物 LOX 具有极高的相似性(图 3, III)。黄瓜 LOX 多序列比对和互作结构模型表明,特定位置上的缬氨酸在酶与底物的互作关系上起到了决定性的作用,这是 9-LOX 的显著特征 (Hornung et al., 1999),在棉花的研究上也得到了相同的结果 (Philippe et al., 2007)。本研究通过唐菖蒲和棉花等其他植物的 *LOX1* 的比对分析,发现在第 564 位的缬氨酸起到类似的作用,表明 *GhLOX1* 也属于 9-LOX。

已有研究显示 9-LOX 在植物器官发育和果实成熟进程中起作用 (Porta & Rocha-Sosa, 2002),但是许多功能仍不明确;13-LOX 参与生物与非生物胁迫条件下的防御反应,并在醛类和醇类物质合成中起作用 (Feussner & Wasternack, 2002; Porta & Rocha-Sosa, 2002; Chehab et al., 2007)。9-LOX 和 13-LOX 在序列上有长度的差异,13-LOX 在 N 端含有额外约 60 个氨基酸残基,这些序列可能是 LOX 的信号肽区域 (张波, 2007),通过 LOX 家族氨基酸比对,结合在 NCBI blast 在线比对表明,本研究得到的 *GhLOX1* 具有 9-LOX 活性。系统进化树和氨基酸序列比对表明唐菖蒲与马铃薯和拟南芥 *LOX1* 同源性较高 (60.7%, 60.1%),其编码的酶缺少一段叶绿体运输肽。在马铃薯的 3 个 *LOX* 基因家族成员中, *PotLX1* (*StLOX1*) 是调控马铃薯块茎发育的关键基因 (Kolomiets et al., 2001),所以, *GhLOX1* 极有可能与唐菖蒲球茎的形成具有密切的关系,有待进一步研究与验证。

LOX 广泛存在于植物根、茎、叶、芽、花、子房、果实和种子等器官中,且具有不同的表达丰度 (Porta & Rocha-Sosa, 2002)。唐菖蒲 *LOX1* 在叶、花、根、匍匐茎、新球、籽球组织里都有表达,其中在匍匐茎和叶中的表达量最高,而在花和籽球中较低。马铃薯的 *LOX1* 在根、匍匐茎与块茎中表达,其中在即将膨大的匍匐茎顶端高效表达 (Feussner et al., 2001)。本研究的结果与马铃薯的表达状况不太一致,这可能与 *LOX1* 表达的时空局限性有关。近年研究表明,LOX 具有多样的亚细胞定位 (Feussner & Wasternack, 2002; Porta & Rocha-Sosa, 2002),其存在部位的不同可能意味着功能的差异。定位于脂球体上的 LOX 参与了大豆等种子的萌发 (Feussner et al., 2001),而存在于细胞质的 LOX 调控了马铃薯块茎发育和拟南芥侧根形成 (Kolomiets et al., 2001; Vellosillo et al., 2007)。本研究将进一步通过亚细胞定位的方法确定唐菖蒲 *LOX1* 具体存在于哪些细胞器中,以分析唐菖蒲 *LOX1* 的基因功能。

以前的研究发现,SHAM 作为 LOX 的抑制剂,通过抑制 LOX 的活性而影响了 JA 生物合成及其化合物的合成,并且抑制唐菖蒲球茎的形成。施加 MJ 得到了相反的结果 (何秀丽, 2008a, 2008b; He et al., 2008)。而 SA 作为途径信号干扰 JA 和乙烯信号在防御反应中的作用,表现在抑制 JA 和乙烯的响应基因 (Thomma et al., 2001; Kunkel & Brooks, 2002)。本研究中发现,对组培唐菖蒲施

以 SA 处理,随着 SA 浓度的增加, *LOX1* 在球茎的表达量减少,表明 SA 具有类似于 SHAM 的作用,抑制了 JA 响应基因 *LOX1* 的表达,但关于 SA 对 JA 生物合成的影响以及对唐菖蒲球茎形成的作用还有待于进一步研究。LOX 与其它物质,尤其是与植物地下变态器官形成的关联及其相关因子的关系仍需要在更广的范围内进行研究。

References

- Chehab E W, Perea J V, Gopalan B, Theg S, Dehesh K. 2007. Oxylin pathway in rice and *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol*, 49 (1): 43 – 45.
- Hornung E, Walther M, Kuhn H, Feussner I. 1999. Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 4192 – 4197.
- Feussner I, Kiihn H, Wasternack C. 2001. Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends Plant Sci*, 6 (6): 268 – 273.
- Feussner I, Wasternack C. 2002. The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol*, 53: 275 – 295.
- Fujino K, Koda Y, Kikuta Y. 1995. Reorientation of cortical microtubules in the subapical region during tuberization in single-node stem segments of potato in culture. *Plant Cell Physiol*, 36: 891 – 895.
- Gan Li-jun, Zeng Xiao-chun, Zhou Xie. 2001. Possible involvement of jasmonates in the morphogenesis of underground storage organs in plants. *Chinese Bulletin of Botany*, 18 (5): 546 – 553. (in Chinese)
- 甘立军, 曾晓春, 周 燮. 2001. 茉莉酸类与植物地下贮藏器官的形成. *植物学通报*, 18 (5): 546 – 553.
- He Xiu-li, Shi Li-wei, Yuan Zhi-hua, Xu Zhe, Zhang Zhi-qian, Yi Ming-fang. 2008. Effects of lipoxygenase on the corm formation and enlargement in *Gladiolus hybridus*. *Scientia Horticulturae*, 118: 60 – 69.
- He Xiu-li, Yuan Zhi-hua, Xu Zhe, Yi Ming-fang. 2008a. Effects of lipoxygenase on the corms formation and enlargement in *Gladiolus hybridus*. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (1): 87 – 93. (in Chinese)
- 何秀丽, 苑智华, 徐 哲, 义鸣放. 2008a. 脂氧合酶对唐菖蒲籽球形成和膨大的影响. *园艺学报*, 35 (1): 87 – 93.
- He Xiu-li, Zhang Zhi-qian, Shi Li-wei, Yuan Zhi-hua, Xu Zhe, Yi Ming-fang. 2008b. Effects of salicylhydroxamic acid and methyl jasmonate on *in vitro* corm formation of *Gladiolus hybridus*. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (5): 707 – 714. (in Chinese)
- 何秀丽, 张智乾, 石立委, 苑智华, 徐 哲, 义鸣放. 2008b. SHAM 和 MJ 对唐菖蒲试管结球的影响. *园艺学报*, 35 (5): 707 – 714.
- Siedow J M. 1991. Plant lipoxygenase: Structure and function. *Annu Rev Plant Mol Biol*, 42: 145 – 188.
- Steczek J, Donoho G P, Clemens J C, Dixon J E, Axelrod B. 1992. Conserved histidine residues in soybean lipoxygenase: Functional consequences of their replacement. *Biochemistry*, 31: 4053 – 4057.
- Kolomiets M V, Hannapel D J, Chen H, Tymenson M, Gladon R J. 2001. Lipoxygenase is involved in the control of potato tuber development. *Plant Cell*, 13: 613 – 626.
- Kunkel B N, Brooks D M. 2002. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol*, 5: 325 – 331.
- Philippe Marmey, Aïda Jalloul, Majd Alhamdia, Komi Assigbetse, Jean-Luc Cacas, Andreas E Voloudakis, Antony Champion, Alain Clerivet, Jean-Luc Montillet, Michel Nicole. 2007. The 9-lipoxygenase *GhLOX1* gene is associated with the hypersensitive reaction of cotton *Gossypium hirsutum* to *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 596 – 606.
- Porta H, Rocha-Sosa M. 2002. Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiol*, 130: 15 – 21.
- Royo J, Vancanneyt G, Perez A G, Sanz C, Siormann K, Rosahl S, Sanchez-Serrano J J. 1996. Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. *J Biol Chem*, 271: 21012 – 21019.
- Thomma B P, Penninckx I A, Broekaert W F, Cammue B P. 2001. The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr Opin Immunol*, 13: 63 – 68.
- Vellosillo T, Martinez M, Lopez M A, Vicente J, Cascon T, Dolan L, Hamberg M, Castresana C. 2007. Oxylin produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *Plant Cell*, <http://www.plantcell.org/cgi/rapidpdf/tpc.106.046052v1>.
- Zhang Bo. 2007. Functional analysis and regulation of LOX gene family in kiwifruit [Ph. D. Dissertation]. Hangzhou: Zhejiang University. (in Chinese)
- 张 波. 2007. 猕猴桃脂氧合酶基因家族的功能解析及其调控 [博士论文]. 杭州: 浙江大学.