

枇杷花发育进程中氨基酸和碳水化合物代谢的变化

徐红霞, 李晓颖, 陈俊伟*

(浙江省农业科学院园艺研究所, 杭州 310021)

摘 要: 为研究影响枇杷 (*Eriobotrya japonica* Lindl. ‘Ninghaibai’) 花的发育相关代谢机制, 以花芽生理分化期、花芽形态分化期、花穗发育期、小花发育期和开花期这 5 个阶段的当年生春梢上顶芽、花芽或花穗为试验材料, 采用 GC-MS 技术检测其代谢物质, 并将 5 个阶段的差异代谢物质进行统计和归类, 筛选出了相关性最高的代谢通路。此外, 测定其可溶性糖、可溶性蛋白、淀粉含量以及 C/N 比, 分析各营养物质在花不同发育阶段的变化。在整个发育进程中共检测出 430 种代谢物, 氨基酸代谢和碳水化合物代谢是两个变化最显著的代谢通路, 而小花发育期是代谢最为旺盛的阶段。可溶性糖、可溶性蛋白、淀粉含量以及 C/N 比的变化趋势与代谢组表型结果一致, C/N 比是决定花发育进程的重要因素之一。

关键词: 枇杷; 花; 代谢组; 氨基酸; 碳水化合物

中图分类号: S 667.3

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2020) 02-0233-09

Studies on the Amino Acid Metabolism and Carbohydrate Metabolism Variation During Flower Development in *Eriobotrya japonica*

XU Hongxia, LI Xiaoying, and CHEN Junwei*

(Institute of Horticulture, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract: In order to study the metabolic mechanism related to flower development in *Eriobotrya japonica*, GC-MS was used as the detection technique. The metabolites in five different developmental processes were detected at physiological differentiation stage, morphological differentiation stage, inflorescence emergence and expansion stage, single flower development stage and blossoming stage. Multivariate statistical analysis was carried out for all the samples, and then the metabolites were statistically classified and the most relevant metabolic pathways were screened out. In this research, the metabolic phenotypes of different flower developmental stages were summarized and analyzed. The soluble sugar, soluble proteins and starch content as well as C/N ratio variation during the five stages were also detected. A total of 430 metabolites were obtained. Amino acid and carbohydrate metabolism were the two most significant metabolic pathways related to flower development, and the metabolism was more vigorous in single flower development stage than the other stages. The soluble sugar, soluble proteins,

收稿日期: 2019-12-20; **修回日期:** 2020-02-12

基金项目: 浙江省重点研发计划项目 (2018C02011); 浙江省农业新品种选育重大科技专项 (2016C02052-3); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31601734)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: chenjunwei@zaas.ac.cn)

starch content and C/N ratio were consistent with the phenotypic results of the metabolome. C/N ratio is one of the important factors determining the development process of flowers.

Keywords: *Eriobotrya japonica*; flower; metabolic; amino acid; carbohydrate

枇杷 (*Eriobotrya japonica* Lindl.) 花芽生理分化始于盛夏, 花期为每年 10 月到次年 2 月。10—11 月第 1 批花所结果实往往较大, 品质好, 但在北亚热带地区易受低温冻害而绝收, 成熟果实主要来自 12 月左右开的第 2 批花和 1—2 月开的第 3 批花受精发育。如何使枇杷花期延长和延迟, 是确保枇杷花和幼果安全越冬的关键 (陈俊伟 等, 2017)。研究花发育进程中相关代谢组分的变化可为花期调节提供基础信息。目前关于枇杷花发育机制的研究主要集中于花芽分化时期, 包括切片观察确定花芽分化时间 (李乃燕 等, 1982), 分化过程中叶片与花芽内营养物质和内源激素的变化 (胡军 等, 1983; 刘宗莉 等, 2007), 以及相关成花基因的克隆和表达 (Liu et al., 2013; Zhang et al., 2016), 而关于枇杷花形成和发育整体过程的生理和代谢机制研究未见报道。

近年来植物代谢组学技术已被广泛应用于检测果树生长发育过程代谢水平的变化 (Cho et al., 2009; Martinelli et al., 2012; Lin et al., 2015)、应对逆境胁迫的响应机制 (Lee et al., 2012; Cappellin et al., 2013) 以及作为指纹图谱鉴定不同物种的地理起源 (Longobardi et al., 2012, 2013)。本研究中以白肉枇杷品种 ‘宁海白’ 为试材, 选取不同发育阶段的顶芽、花芽或花穗进行代谢组学研究, 以期了解影响枇杷花发育进程的主要物质成分及其代谢途径, 揭示花发育进程生理与代谢机制, 为其花期调控措施实施提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为种植于浙江省嘉兴市海宁县浙江省农业科学院园艺研究所杨渡试验基地的 10 年生 ‘宁海白’ 枇杷 (*E. japonica* ‘Ninghaibai’)。

2015 年选取长势基本一致枇杷树 6 株, 分别在花芽生理分化期 (7 月 10 日)、花芽形态分化期 (8 月 10 日)、花穗发育期 (9 月 10 日)、小花发育期 (9 月 20 日) 和开花期 (10 月 10 日), 从每株树上采集当年生春梢上顶芽、花芽或花穗 5~10 个, 经液氮冷冻后运回实验室进行代谢组学检测, 6 个生物学重复。

另外, 以 2 株树为一组, 采集当年生春梢上顶芽、花芽或花穗, 用于测定各发育阶段可溶性糖、淀粉、可溶性蛋白以及全氮含量, 3 个生物学重复。

1.2 代谢物萃取及其衍生化

精密称取 0.05 g 样本于 2 mL EP 管中, 加入 0.4 mL 甲醇: 水 (3:1, 体积比), 再加入 20 μ L 核糖醇 ($2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 漩涡混匀, 加入钢珠, 放入研磨仪处理 (65 Hz, 5 min); 然后 4°C , $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min; 小心地取出 0.35 mL 上清液于 2 mL 进样瓶 (甲烷硅基化的) 中; 同时每个样本均取约 11 μ L (根据样本量而定) 于新的 2 mL 进样瓶中混匀, 混样作为质控 (QC) 样本。

在真空浓缩器中干燥提取物, 然后向干燥后的代谢物加入 40 μ L 甲氧胺盐试剂 (甲氧胺盐酸盐, 溶于吡啶 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 轻轻混匀后放入烘箱中 80°C 孵育 20 min; 再向每个样品中迅速加入 50 μ L BSTFA (含有 1% TCMS, 体积比), 将混合物 70°C 孵育 1 h; 冷却至室温, 向混样中加入 5 μ L FAMES

(饱和脂肪酸甲酯标准混合液, 溶于氯仿 C8 - C16: $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; C18 - C24: $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); 混匀后上机检测。

1.3 代谢物的 GC - MS 检测与数据分析

采用安捷伦公司 (Agilent Technologies Inc. CA, USA) Agilent 7890A 气质联用仪进行物质分离检测: Restek Rxi-5Sil MS 毛细管柱 ($30 \text{ m} \times 250 \mu\text{m} \times 0.25 \mu\text{m}$, Restek, USA) 载入高纯氦气, 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 前样口温度 $280 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。进样量 $1 \mu\text{L}$, 采用不分流模式, 溶剂延迟 366 s; 初始柱温 $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持 1 min, 以 $10 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率上升至 $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 保持 5 min。电子轰击离子源 (EI), 离子源温度 $220 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 电离电压 -70 eV 。扫描方式为 $30 \sim 600 \text{ m/z}$ 。每 6 个分析样本中插入 1 个 QC 样本, 以检测整个分析过程的重复性。

从原始文件中, 共获得 8 个 QC 样本和 30 个样品, 共 453 个峰。为了能够对下游数据进行更好的分析, 利用 LECO 公司的 Chroma TOF 4.3X 软件和 Fiehn Rtx 5 数据库对数据进行过滤, 并对原始数据中的缺失值进行模拟, 然后对填补完以后的数据使用内标归一法进行标准化处理, 去冗余峰合并后得到色谱图和数据矩阵 (Kind et al., 2009), 过滤后保留 430 个峰。

将数据矩阵中的数值进行 \log_2 转换后, 导入 SIMCA 软件包进行多元统计分析, 先采用主成分分析 (PCA) 以观察各样本之间的总体分布和整个分析过程的稳定性 (阿基业, 2010), 然后用 (正交) 偏最小二乘法分析 (OPLS-DA) 来区分各组间代谢物的总体差异, 找到组间的差异代谢物。OPLS-DA 分析中变量权重 (VIP) 大于 1 的变量被认为是差异变量。

代谢通路由 KEGG 数据库 (<http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway.html>) 简化而来, 热图由 Microsoft Excel 2016 完成。

1.4 营养物质含量测定

可溶性总糖和淀粉的测定参考 Rosa 等 (2009) 的方法, 可溶性蛋白含量测定参考 Bradford (1976) 的方法进行。

全氮测定参照鲁如坤 (1999) 的方法, 将样品于 $105 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 杀青 0.5 h, 再在 $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下烘干, 粉碎过筛, 用 $\text{H}_2\text{SO}_4 - \text{H}_2\text{O}_2$ 消煮法提取样品中的氮, 用扩散法测定氮含量。

$\text{C/N} = (\text{可溶性糖含量} + \text{淀粉含量}) / \text{全氮含量}$ 。

采用 SPSS 11.5 软件对数据进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 枇杷花发育过程的形态变化

将枇杷花发育过程分为 5 个阶段, 如图 1 所示。

生理分化期 (EjS1), 从形态上看花芽和叶芽没有明显的差别; 花芽形态分化期 (EjS2), 花芽顶端开始变圆突起; 花穗发育期 (EjS3), 花穗主轴上分化出支轴; 小花发育期 (EjS4), 花穗各支轴上出现小花花蕾; 花朵发育完全, 进入开放期 (EjS5)。



图 1 枇杷花发育过程的形态变化

EjS1 ~ EjS5 分别为花芽生理分化期、花芽形态分化期、花穗发育期、小花发育期和开花期。下同。

Fig. 1 Morphological observation of flower developmental stage in loquat

EjS1 – EjS5 showed physiological differentiation stage, morphological differentiation stage, inflorescence emergence and expansion stage, single flower developmental stage and blossoming stage, respectively. The same below.

2.2 GC – MS 化合物的鉴定和定量分析

用气相色谱—质谱联用仪检测 30 个样品的总代谢物含量。从原始文件中总共鉴定了 453 个色谱峰，对数据进行过滤后保留 430 个色谱峰，其中鉴定为植物代谢物的有 196 种，不能确定类型或者未知的化合物有 234 种。从图 2 可以看出不同发育阶段分离出的代谢物质含量有显著差异。

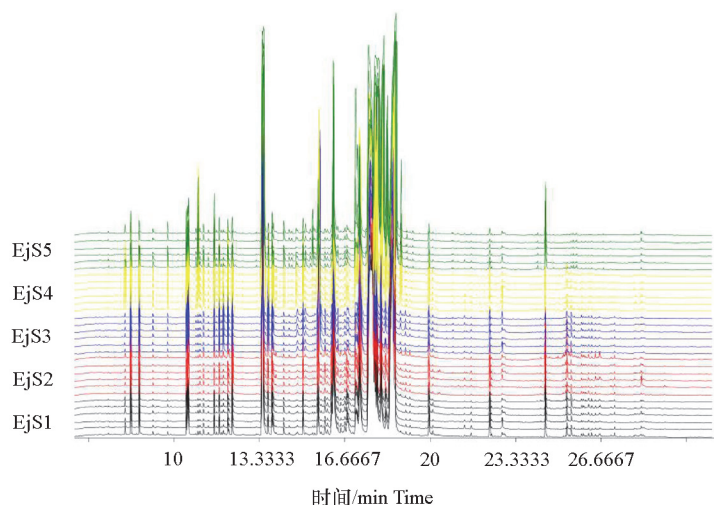


图 2 枇杷花不同发育阶段 GC – TOF/MS TIC 色谱图

Fig. 2 GC – TOF/MS TIC chromatograms of different developmental stages of flower in loquat

2.3 差异代谢物分析

根据模型筛选出的差异代谢物质结果，EjS2 与 EjS1 比较获得 17 种差异代谢物质，EjS3 与 EjS2 比较获得 56 种差异代谢物质，EjS4 与 EjS3 比较获得 104 种差异代谢物质，而 EjS5 与 EjS4 比较获得 111 种差异代谢物质。说明在枇杷花发育进程中，越到发育后期，参与代谢途径越复杂。这些差异代谢物质的 KEGG 分析结果（图 3）显示，差异物质在代谢相关通路中主要富集在氨基酸代谢、碳水化合物代谢、维生素等辅助因子代谢、其他氨基酸代谢、能量代谢、核苷酸代谢、脂类代谢和次生代谢产物合成这几条途径。其中，氨基酸代谢和碳水化合物代谢是不同发育阶段差异物质最多的两个代谢途径。

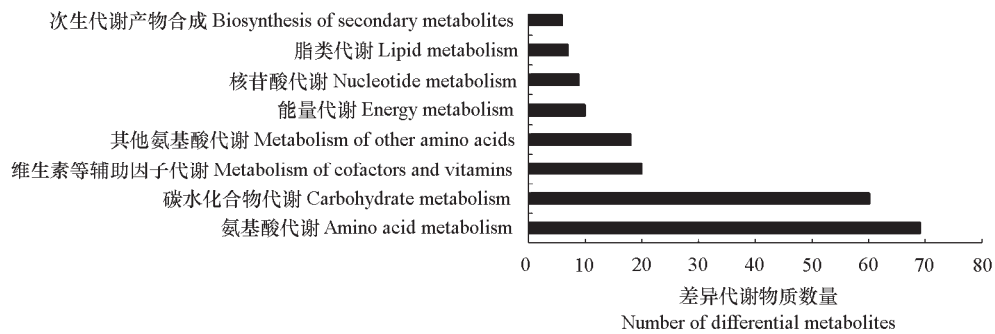


图 3 枇杷花不同发育阶段差异代谢物质主要代谢通路富集分析

Fig. 3 Enrichment analysis of main metabolic pathways of differential metabolites in different developmental stages of loquat flower

将氨基酸代谢相关途径的差异物质进行聚类分析发现, 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸代谢途径, 以及赖氨酸代谢途径相关代谢物质含量在 EjS1 和 EjS2 阶段变化不明显 (图 4)。

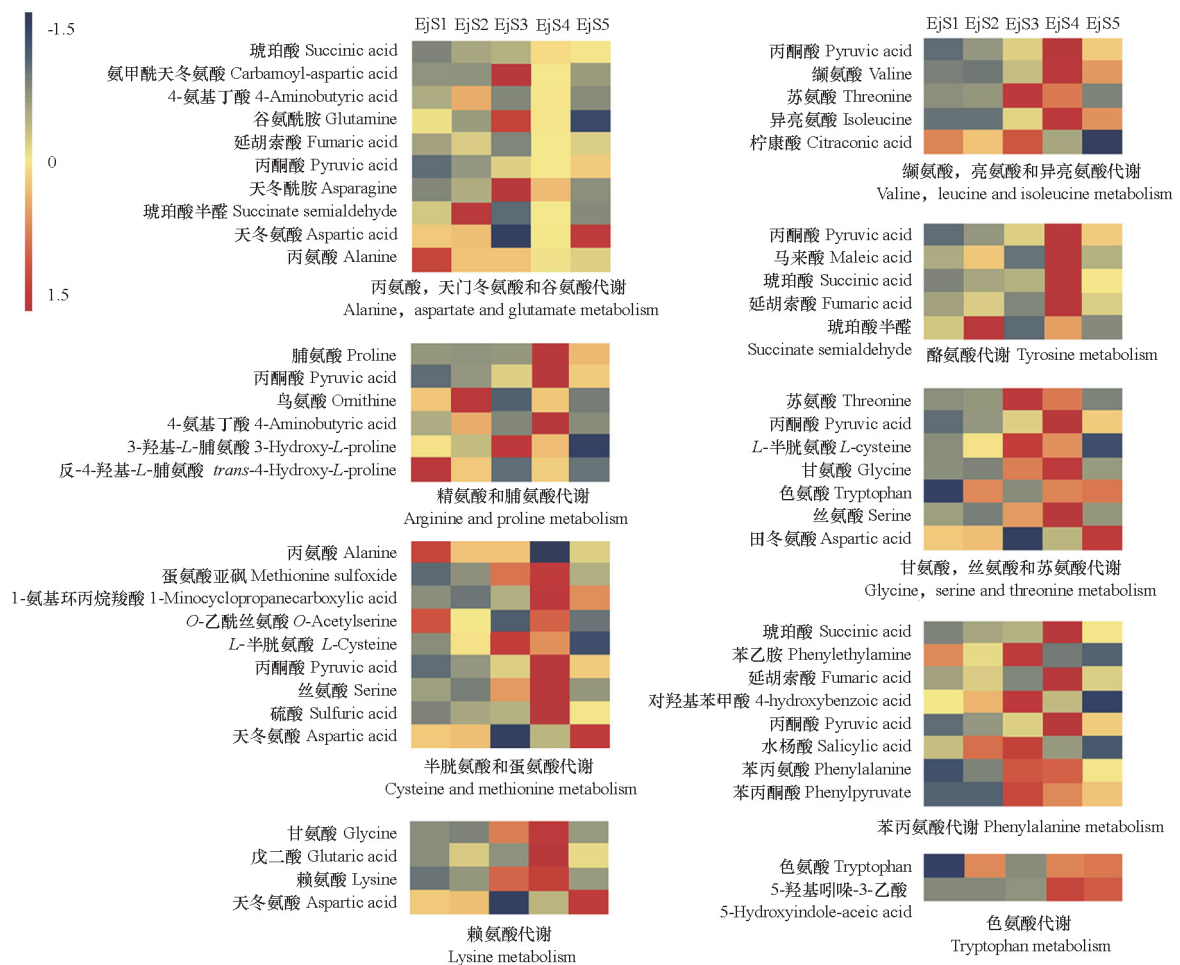


图 4 氨基酸代谢途径相关代谢物质含量热图

Fig. 4 Heat map analysis of metabolites contents related to amino acid metabolism pathway

从各氨基酸代谢途径来看, 丙氨酸和反式-4-羟基-L-脯氨酸含量在 EjS1 阶段比较高; 琥珀酸半醛和鸟氨酸含量在 EjS2 阶段最高。而在枇杷花发育的后 3 个阶段, 各种差异物质含量变化比较显著, 特别是 EjS4 阶段, 参与各个氨基酸代谢途径的琥珀酸、丙酮酸、4-氨基丁酸、延胡索酸、甘氨酸、丝氨酸、1-氨基环丙烷羧酸、缬氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、戊二酸、4-氨基丁酸、脯氨酸、马来酸和 5-羟基吡啶-3-乙酸等代谢物质的含量达到整个发育过程的最高值。在 EjS5 阶段, 这些物质含量都明显下降, 但此时天冬氨酸含量显著高于其他发育阶段 (图 4)。

差异代谢物质在碳水化合物代谢途径中的富集程度仅次于氨基酸代谢途径。其中, 半乳糖代谢、淀粉和蔗糖代谢、果糖和甘露糖代谢在花芽分化阶段比较活跃, 半乳糖醇、糖酸、乳糖和肌醇含量在 EjS2 阶段下调, 而半乳糖酸、山梨醇、纤维二糖、海藻糖和阿洛糖含量在 EjS2 阶段上调; 而其他途径如糖酵解/糖异生、三羧酸循环、戊糖磷酸途径、氨基糖与核苷酸糖代谢、丁酸代谢、戊糖和葡萄糖醛酸盐相互转化以及乙醛和二羧酸代谢中大多数相关代谢物质在 EjS4 阶段呈显著上调的趋势。而在 EjS5 阶段, 戊糖磷酸途径和三羧酸循环途径代谢仍相对活跃 (图 5)。

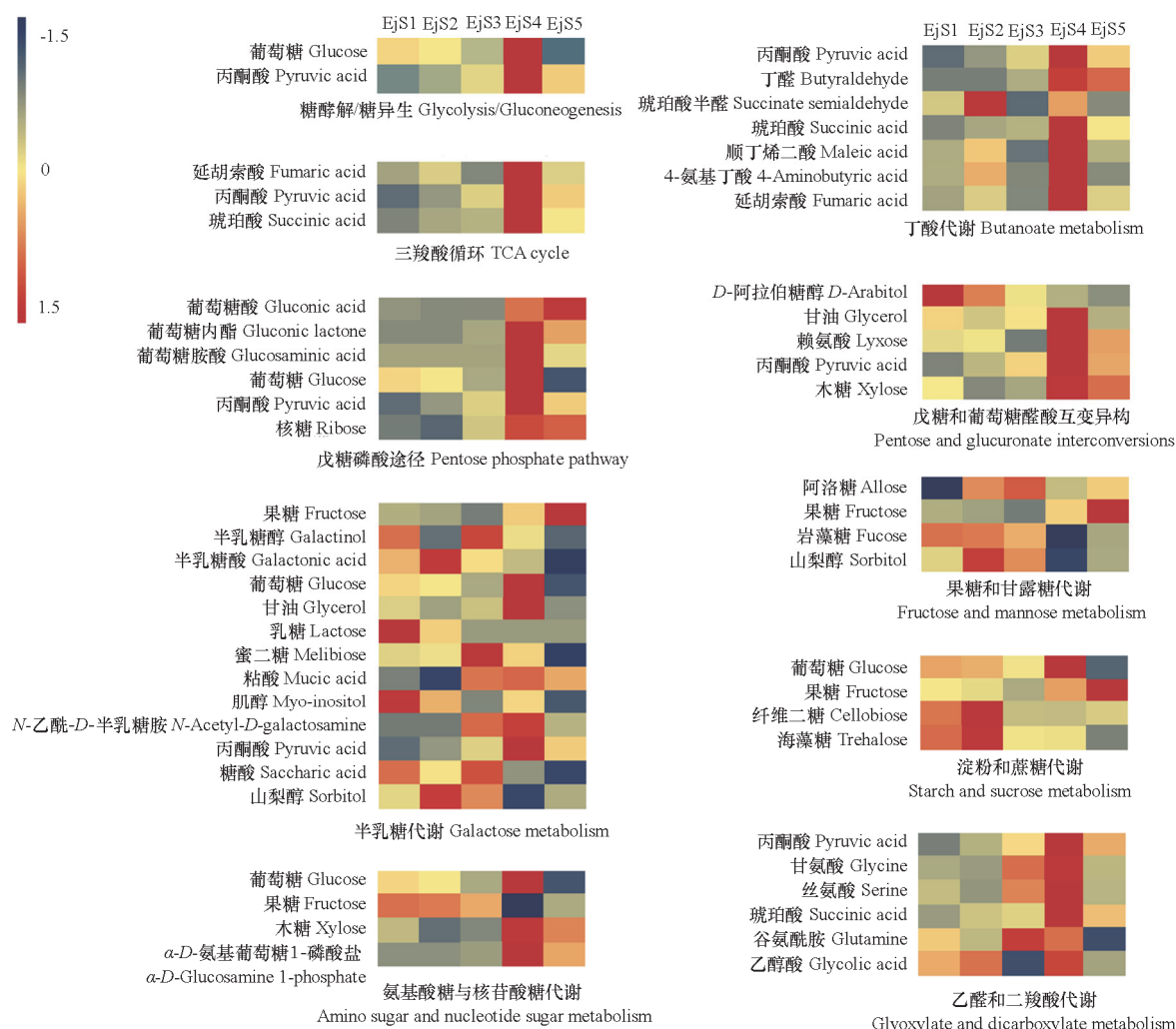


图 5 碳水化合物代谢途径相关代谢物质含量热图

Fig. 5 Heat map analysis of metabolites contents related to carbohydrate metabolism pathway

2.4 枇杷花发育过程中碳水化合物和蛋白质含量的变化

可溶性糖含量呈现升高—下降—升高的变化趋势, 其含量在 EjS1 阶段最低, EjS2、EjS3、EjS4 和 EjS5 阶段比 EjS1 阶段分别上升了 23.2%、13.2%、38.3%和 95.9% (图 6, A)。淀粉含量呈现先升高—下降—升高—下降的变化趋势, 在 EjS2 阶段有个小高峰, 在 EjS4 阶段达到顶峰, 是 EjS3 阶段的 6.1 倍 (图 6, B)。可溶性蛋白含量呈现先上升—下降—上升的变化趋势, 其在 EjS2 阶段达到最高值, 在 EjS4 阶段最低, 最高值是最低值的 3.7 倍 (图 6, C)。C/N 比的变化趋势与可溶性糖含量变化趋势类似, 其在 EjS2 阶段显著高于 EjS1 阶段, 花芽分化结束后明显下降, 随后在 EjS4 阶段和 EjS5 阶段又剧烈升高, 分别为 EjS1 阶段的 1.8 倍和 2.4 倍 (图 6, D)。

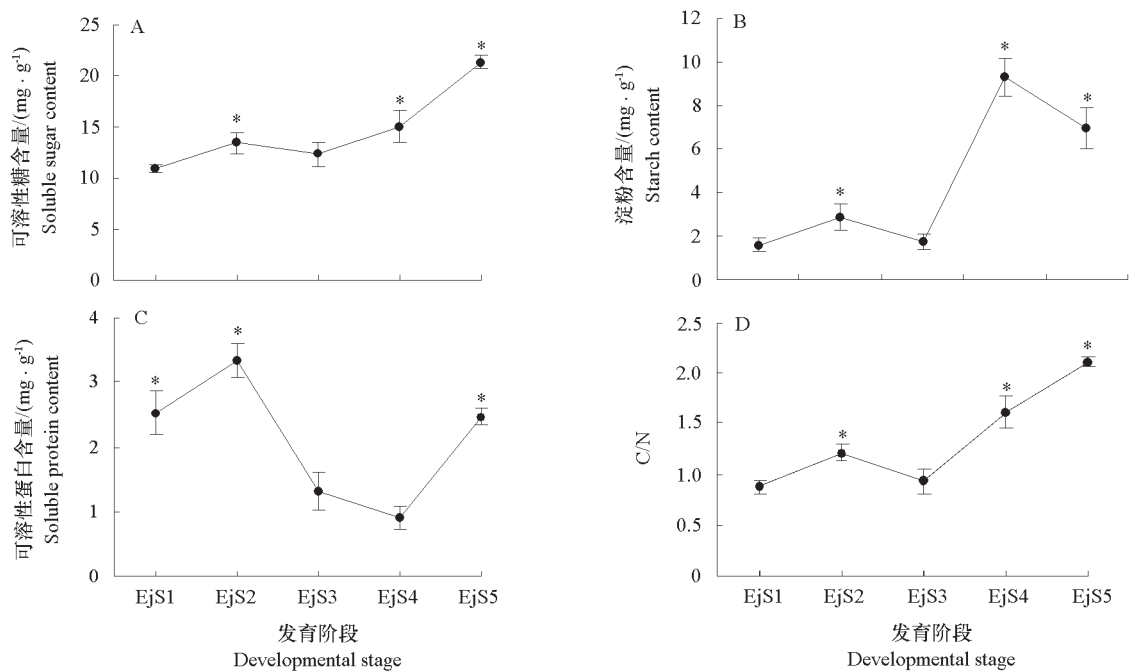


图 6 不同发育阶段可溶性糖含量 (A)、淀粉含量 (B)、可溶性蛋白含量 (C) 和 C/N 比 (D) 的变化
Fig. 6 The change of soluble sugar (A), starch (B) and soluble proteins (C) content and C/N ratio (D)
during different developmental stages

* $P < 0.05$.

3 讨论

氨基酸是合成蛋白质的重要原料。在本试验中, 氨基酸代谢是受枇杷花发育进程影响最显著的代谢途径之一。在花芽形态分化前以可溶性蛋白质积累为主, 花芽形态分化开始后, 积累的蛋白质开始消耗, 转变成各种氨基酸, 用于建成新生细胞的结构蛋白或者合成各种酶类参与细胞代谢, 导致可溶性蛋白质含量持续减少, 并在小花发育期达到最低。相应地, 从氨基酸代谢相关途径的差异物质聚类图来看, 花芽形态分化阶段与生理分化阶段相比, 氨基酸代谢物质比较稳定, 但是分化结束进入花穗发育阶段后, 氨基酸代谢非常活跃, 很多氨基酸代谢相关物质含量在小花发育阶段达到最高; 当小花形成后, 氨基酸代谢开始变得不活跃, 开花阶段又重新升高。

碳水化合物是最基础也是最重要的生命活动能量的来源。在本试验中, 淀粉含量在枇杷花芽形

态分化阶段和小花发育阶段出现两个峰值,相对应的可溶性糖含量在花芽形态分化期出现 1 个峰值,且小花发育阶段可溶性糖含量急剧增加并在开花期达到顶峰。碳水化合物代谢途径分析也显示,半乳糖代谢、淀粉和蔗糖代谢、果糖和甘露糖代谢在花芽形态分化期比较活跃。可能与这几条代谢途径能提供大量的低分子可溶性糖,为花芽分化做准备有关。在小花发育阶段,一方面小花中花器官迅速形成,另一方面花序快速生长。此时细胞分裂和生长都很旺盛,需要代谢大量的可溶性糖用于合成细胞壁相关组分,如纤维素、果胶、半纤维素和木质素等。另外,花的发育需要大量能量参与,而碳水化合物代谢与能量代谢紧密相关,如糖酵解途径、TCA 循环途径以及戊糖磷酸途径,能释放出大量的自由能参与各种生命活动。因此,碳水化合物代谢在小花发育阶段最活跃,相关代谢物质如葡萄糖、丙酮酸、延胡索酸、琥珀酸、甘氨酸、丝氨酸和木糖等含量达到顶峰。

从本研究结果来看,枇杷花的发育过程需要大量的氮素营养和碳素营养,而 C/N 比是决定花发育进程的重要因素之一,这也与传统的碳氮学说一致。氮素营养和碳素营养都需要积累到一定程度才能启动花芽分化,但是当碳素营养占优势时即 C/N 比显著升高时,花芽分化才会受到促进,相反氮素营养占优势即 C/N 比较低时,就会以营养生长为主,花芽分化受到抑制。胡军等(1983)也发现在枇杷花芽形态分化前 C/N 有一个高峰期。有研究表明花芽生理分化的起点与当年生枝条的停长时间点紧密相连(Kotoda et al., 2000)。因此,要对枇杷花期进行调控,推迟枇杷花芽分化时间,可以在生理分化期之前适当增加树体中氮肥含量,延长当年生枝条的生长时间。此外,本结果也显示枇杷花穗发育和开花过程需要更高的 C/N 比。在这期间,生产上可以采取一些措施促进树体氮肥吸收,或者降低树体碳同化能力,从而达到推迟或者延长开花时间的目的。

枇杷花的发育进程所涉及的代谢过程错综复杂,而氨基酸代谢、碳水化合物代谢是枇杷花发育进程中变化最显著也是最重要的两条途径。氮元素和碳元素在整个花发育过程中的动态变化是一个自然的周期性变化过程,可以通过人为干扰树体营养的方法影响这个变化周期,从而调整开花节奏。

References

- A Jiye. 2010. Analysis of metabolomics data: principal component analysis. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 15 (5): 481 – 489. (in Chinese)
- 阿基业. 2010. 代谢组学数据处理方法——主成分分析. *中国临床药理学与治疗学*, 15 (5): 481 – 489.
- Bradford M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248 – 254.
- Cappellin L, Aprea E, Granitto P, Romano A, Gasperi F, Biasoli F. 2013. Multiclass methods in the analysis of metabolomic datasets: the example of raspberry cultivar volatile compounds detected by GC – MS and PTR – MS. *Food Res Int*, 54 (1): 1312 – 1320.
- Chen Jun-wei, Sun Jun, Li Xiao-ying, Xu Hong-xia, Zhou Xiao-yin, Jiang Lu-hua. 2017. Study on later flowering cultivation techniques to avoid freezing in white loquat. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 58 (3): 417 – 419. (in Chinese)
- 陈俊伟, 孙 钧, 李晓颖, 徐红霞, 周晓音, 姜路花. 2017. 白肉枇杷晚花避冻栽培技术探讨. *浙江农业科学*, 58 (3): 417 – 419.
- Cho S K, Yang S O, Kim S H, Kim H, Ko J S, Riu K Z, Lee H Y, Choi H K. 2009. Classification and prediction of free-radical scavenging activities of Dangyuja (*Citrus grandis* Osbeck) fruit extracts using ¹H NMR spectroscopy and multivariate statistical analysis. *J Pharm Biomed Anal*, 49 (2): 567 – 571.
- Hu Jun, Zhang Shang-long, Li Nai-yan. 1983. Relationship between flower bud differentiation and metabolism of some substances in loquat trees. *Acta Agriculturae Universitatis Zhejiangensis*, 9 (4): 307 – 314. (in Chinese)
- 胡 军, 张上隆, 李乃燕. 1983. 枇杷花芽分化与体内某些物质代谢关系的研究. *浙江农业大学学报*, 9 (4): 307 – 314.
- Kind T, Wohlgemuth G, Lee D Y, Lu Y, Palazoglu M, Shahbaz S, Fiehn O. 2009. FiehnLib: mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem*, 81 (24): 10038 – 10048.

- Kotoda N, Wada M, Komori S, Kidou S I, Abe K, Masuda T, Soejima J. 2000. Expression pattern of homologues of floral meristem identity genes *LFY* and *API* during flower development in apple. *J Amer Soc Hort Sci*, 125 (4): 398 - 403.
- Lee J, Mattheis J P, Rudell D R. 2012. Antioxidant treatment alters metabolism associated with internal browning in ‘Braeburn’ apples during controlled atmosphere storage. *Postharvest Biol Tec*, 68: 32 - 42.
- Li Nai-yan, Zhang Shang-long, Liu Quan, Wang Ju-sheng. 1982. Observation of loquat floral bud differentiation. *China Fruits*, 3: 12 - 14. (in Chinese)
- 李乃燕, 张上隆, 刘 权, 王菊生. 1982. 枇杷花芽分化的观察. *中国果树*, (3): 12 - 14.
- Lin Q, Wang C Y, Dong W C, Jiang Q, Wang D L, Li S J, Chen M, Liu C L, Sun C D, Chen K S. 2015. Transcriptome and metabolome analyses of sugar and organic acid metabolism in Ponkan (*Citrus reticulata*) fruit during fruit maturation. *Gene*, 554 (1): 64 - 74.
- Liu Y X, Song H W, Liu Z L, Hu G B, Lin S Q. 2013. Molecular characterization of loquat *EjAPI* gene in relation to flowering. *Plant Growth Regul*, 70: 287 - 296.
- Liu Zong-li, Lin Shun-quan, Chen Hou-bin. 2007. Time course changes of endogenous hormone levels during the floral and vegetative buds formation in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) . *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (2): 339 - 344. (in Chinese)
- 刘宗莉, 林顺权, 陈厚彬. 2007. 枇杷花芽和营养芽形成过程中内源激素的变化. *园艺学报*, 34 (2): 339 - 344.
- Longobardi F, Ventrella A, Bianco A, Catucci L, Cafagna I, Gallo V, Mastrorilli P, Agostiano A. 2013. Non-targeted ¹H NMR fingerprinting and multivariate statistical analyses for the characterisation of the geographical origin of Italian sweet cherries. *Food Chem*, 141 (3): 3028 - 3033.
- Longobardi F, Ventrella A, Napoli C, Humpfer E. 2012. Classification of olive oils according to geographical origin by using ¹H NMR fingerprinting combined with multivariate analysis. *Food Chem*, 130 (1): 177 - 183.
- Lu Ru-shen. 1999. Methods of soil chemical analysis. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press. (in Chinese)
- 鲁如绅. 1999. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社.
- Martinelli F, Basile B, Morelli G, d’Andria R, Tonutti P. 2012. Effects of irrigation on fruit ripening behavior and metabolic changes in olive. *Sci Hort*, 144: 201 - 207.
- Rosa M, Hilal M, Gonzalez J A, Prado F E. 2009. Low-temperature effect on enzyme activities involved in sucrose-starch partitioning in salt-stressed and salt-acclimated cotyledons of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seedlings. *Plant Physiol Biochem*, 47 (4): 300 - 307.
- Zhang L, Yu H, Lin S, Gao Y. 2016. Molecular characterization of *FT* and *FD* homologs from *Eriobotrya deflexa* Nakai forma *koshunensis*. *Front Plant Sci*, 7: 8.