

桂花分子生物学研究进展

顾恒, 杨秀莲, 王良桂*

(南京林业大学南方现代林业协同创新中心, 林草学院, 水土保持学院, 风景园林学院, 南京 210037)

摘要: 桂花(*Osmanthus fragrans*)是一种集绿化、美化和香化于一体的重要观赏树种, 备受人们的关注。近年来, 测序技术的发展和完善极大地推动了桂花分子生物学研究。该文基于现有文献, 对桂花分子生物学研究的最新进展进行了归纳总结。首先综述了桂花全基因组和相关基因家族分析的研究; 随后重点关注了转录组测序在桂花花色、花香、叶色等重要性状方面的研究进展; 同时概述了桂花蛋白组和功能基因的相关报道; 最后对桂花分子生物学相关研究进行了总结, 并对今后重点研究方向进行了展望, 以期为桂花研究提供参考。

关键词: 桂花; 全基因组; 转录组; 蛋白组; 功能基因

doi: 10.11926/jtsb.4861

CSTR:32235.14.jtsb.4861

Progress in Molecular Biological Studies of *Osmanthus fragrans*

GU Heng, YANG Xiulian, WANG Lianggui*

(Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, College of Forestry and Grassland, College of Soil and Water Conservation, College of Landscape Architecture, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: *Osmanthus fragrans* is an important ornamental species integrating greening, beautification and fragrance, which has been attracting much attention. In recent years, the development and improvement of sequencing technology has greatly promoted the research on molecular biology of *O. fragrans*. Based on the literatures, the recent progress of molecular biology research on *O. fragrans* was summarized. Firstly, the whole genome of *O. fragrans* and related gene family analysis were reviewed. Seconded, the progress of transcriptome sequencing on important traits were further elaborated, such as the flower coloration, floral scent and leaf color; Then, the reports of *O. fragrans* proteome and functional genes were discussed; Finally, the molecular biology research of *O. fragrans* were summarized, which made an outlook of the future key research directions and providing the references of *O. fragrans* research in the future.

Key words: *Osmanthus fragrans*; Whole genome; Transcriptome; Proteome; Functional gene

桂花(*Osmanthus fragrans*)是木犀科(Oleaceae)木犀属常绿植物, 为中国传统的十大名花, 历来深受文人雅士的喜爱。桂花资源丰富, 利用价值高^[1-3]。依据花期、花色和叶色可将桂花分为五大品种群, 即金桂品种群、银桂品种群、丹桂品种群、四季桂品种群和彩叶桂品种群^[4-6]。长期以来, 学者们对

桂花开展了大量研究工作, 在育种^[7]、生理^[8]、生化^[9-10]等方面均取得了一定的进展。然而不同桂花品种存在花色、花香和叶色差异, 其形成原因尚不清楚, 作用机制也未得到更深层次的探讨。

随着生物技术的快速发展, 越来越多的观赏植物进入分子生物学的时代。分子生物学相关技术作

收稿日期: 2023-10-22

接受日期: 2024-01-04

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31870695); 江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD)资助

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31870695), and the Project for Superior Discipline Construction of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD).

作者简介: 顾恒(1994年生), 男, 博士研究生, 主要从事园林植物遗传与育种研究。E-mail: guheng2021@163.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: wlg@njfu.edu.cn

为一种解决传统育种和栽培技术在花色、花香和抗逆性调控等方面的辅助工具, 在提高植物育种效率和种质改良方面发挥着重要作用。桂花作为具有极高价值的观赏植物, 其分子生物学方面的研究亦有许多报道但至今没有系统的总结。基于现已发表的文献, 本文将从桂花全基因组、转录组、蛋白组以及功能基因研究等几个方面总结桂花分子生物学研究的重要进展, 并探讨目前存在的问题和今后重点研究的方向, 以期为后续桂花相关研究工作提供参考。

1 桂花全基因组研究

1.1 全基因组测序

植物全基因组测序是指通过基因组学的方法揭示植物的遗传蓝图以及群体水平上的基因差异变化。2000年, 在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)成为第1个公开全基因组序列^[11]之后, 随着测序技术的快速发展和测序成本的降低, 越来越多的植物全基因组信息相继公开。2018年, 南京林业大学率先对桂花品种‘日香桂’(‘Rixiang Gui’)进行了全基因组测序, 共获得45 542个基因, 其中95.68%的基因被功能注释^[12]。这是桂花全基因组的首次报道, 为科研人员从分子水平上理解桂花基因的结构、组成和功能提供了全新的视野。随后, 另一桂花品种‘柳叶金桂’(‘Liuye Jingui’)的全基因组被报道^[13]。这2个高质量桂花品种全基因组数据的公布将有利于其遗传改良和分子生物学问题的深入研究。

1.2 全基因组基因家族分析

桂花全基因组的公布为其在分子水平上的研究奠定了基础和信息支撑。基于全基因组数据, 研究人员对不同类型的基因家族进行了分析, 主要涉及花香、花开放和非生物胁迫。

(1) 花香相关基因家族分析。桂花香气浓郁, 沁人心脾, 其香气物质受到基因的调控。部分与花香相关的基因家族进行了研究, 鉴定出WRKY基因家族的154个基因, 并对8个*OjWRKYs*基因进行了不同组织表达量检测, 其中*OjWRKY139*的表达模式与单萜类化合物相关, 暗示其在调节桂花芳香族化合物合成中具有潜在的作用^[14]。在对MYB基因家族分析的过程中共确定212个*OjMYBs*基因, 而在花器官中有表达的只有3个基因:*OjMYB1R70*、*OjMYB1R114*和*OjMYB1R201*^[15]。对P450基因家族

分析表明, 共计鉴定出276个基因, 其中*OjCYP142*与芳樟醇合成基因*OjTPS2*的相关性最高, 瞬时表达和稳定转化的结果表明, *OjCYP142*可以增加桂花香气中重要挥发性有机化合物芳樟醇的含量^[16]。

(2) 花开放相关基因家族的分析。开花是观赏植物生命周期中至关重要的发育阶段^[17]。而生长素与植物生长发育的许多方面有关, 尤其在花开放过程中起着关键作用^[18-19]。生长素反应因子(ARFs)是生长素介导途径中的重要蛋白。Chen等^[20]从桂花ARF基因家族中检测分析出50个基因, 进一步比较了花朵开放不同阶段的表达谱以及ARFs与内源IAA水平的关系, 推测*OjARFs*是通过生长素介导途径参与花开放的过程。在对XTH基因家族的分析中共鉴定出38个*OjXTHs*基因, 其中*OjXTH24/OjXTH27/OjXTH32/OjXTH35*的表达显著增加, 推测这些基因可能通过对环境温度变化的响应, 参与细胞扩增或细胞壁弱化从而调控花开放^[21]。有研究表明, 植物花瓣衰老过程中乙烯含量会上升, 在桂花ACO基因家族中共鉴定出122个基因, 其中*OjLYG006223*、*OjLYG007706*、*OjLYG007045*和*OjLYG-035696*等4个成员在开花后期上调表达, 暗示这些基因参与调控桂花花瓣的衰老^[22]。

(3) 非生物胁迫相关基因家族分析。桂花在生长发育过程中会遭受各种各样的非生物胁迫, 如冷胁迫、干旱胁迫和盐胁迫^[23-25]。在长期进化过程中, 桂花形成了抵御非生物胁迫的能力。近年来, 有关桂花非生物胁迫基因家族的分析也有报道, 尤以抗寒方面居多。通过对桂花bHLH基因家族成员进行分析, 鉴定出206个基因, 其中,*OjbHLH120/OjbHLH128/OjbHLH163*的表达水平在低温处理下有明显的上调或下调, 表明这些基因可能直接参与调控桂花响应低温反应^[26]。另一项研究表明, 在桂花NAC基因家族成员中共鉴定出119个基因, 其中*OjNAC49*和*OjNAC59*在整个冷处理过程中均被显著诱导并高水平表达, 可作为今后桂花抗寒性改良的候选基因^[27]。在桂花HSF基因家族成员中确定了46个基因, *OjHSFs*可不同程度地受冷胁迫诱导, 值得注意的是*OjHSF11*和*OjHSF43*的表达都有恢复到冷处理前水平的趋势^[28]。此外, 最近的一项研究表明, 在ZAT基因家族中确定的38个成员, 烟草瞬时过表达的结果表明*OjZAT35*基因是耐冷性的负调控因子^[29]。

除了冷胁迫之外, 盐胁迫和干旱胁迫方面的基

因家族分析也有报道。在对桂花 GT 基因家族分析中共确定了 56 个基因,值得注意的是,在不同的胁迫诱导过程中, *OfGTs* 基因表现出多种共表达模式:瞬时表达 *OfGT3/OfGT42/OfGT46* 基因后,MDA 含量降低,暗示这些基因可以提高桂花的耐盐性^[30]。此外,一项关于 CCCH 基因家族的分析共鉴定出 66 个基因,其中有 5 和 13 个基因分别在盐胁迫和干旱胁迫中有表达,表明这些基因在响应非生物胁迫中具有重要作用^[31]。

2 桂花转录组研究

转录组是指特定条件下细胞内所有转录产物的集合^[32]。和基因组不同,转录组测序可以提供一系列信息,包括基因结构域功能注释、可变切割、转录测序、差异基因表达分析和基因功能分类^[33-34];还可以推断未知基因的功能,揭示相关基因的调控机制。随着生物技术的快速发展,转录组学在桂花研究中应用越来越广泛,主要涉及花色、花香、花开放、叶色以及果实发育等方面。

2.1 花色相关转录组测序

花色是桂花重要的观赏性状。桂花的花色由类胡萝卜素主导,因花瓣中类胡萝卜素含量多少而呈现乳白、浅黄、黄、金黄、橙、橙红等色^[4,35-36]。而类胡萝卜素含量的变化会受到代谢途径中关键酶基因的调控^[37]。在‘早银桂’(‘Zao Yingui’)和‘橙红丹桂’(‘Chenghong Dangui’)花朵的转录组测序中共鉴定出 237 个参与类胡萝卜素和类黄酮合成的候选基因^[38]。通过对‘堰红桂’(‘Yanhong Gui’)花瓣的转录组测序以及类胡萝卜素含量的测定分析,最终确定了 15 个与‘堰红桂’花瓣着色相关的关键基因^[39]。以四季桂‘金玉台阁’(‘Jinyu Taige’)为实验材料,对初花期和盛花期花朵进行转录组测序,鉴定得到 9 个类胡萝卜素合成基因^[40]。此外,最近一项有关不同桂花品种花色的转录组研究表明,类胡萝卜素含量和组成的差异使花瓣呈现出多样化的颜色, *OfN-CED3*、*OfDXS2*、*OfCCD1*、*OfGGPPS2*、*OfDXR3*、*OfBCH2* 和 *OfCCD4* 的表达水平是调节类胡萝卜素积累的关键因素^[41]。上述工作了解桂花花色形成的分子机理提供了参考。

2.2 花香相关转录组测序

桂花花朵形小量繁,花香独特迷人,深受人们

的喜爱。因其香味独特,一直以来花香是桂花研究的热点。相关研究表明,萜类化合物(芳樟醇、芳樟醇衍生物、香樟烯、香樟烯衍生物、肉桂烯、顺式氧化芳樟醇和反式氧化芳樟醇)是桂花香气的主要挥发物^[9-10,42-43],在香气形成中发挥着重要作用。对‘日香桂’初花期、盛花期和末花期的花朵进行转录组测序,在萜类代谢途径中发现了一些与花香合成相关的候选基因(*OfMYB1*、*OfMYB6*、*OfWRKY1* 和 *OfWRKY3*)^[44]。通过转录组测序筛选出 4 个与已知萜类化合物具有高度同源性的候选 *OfUGTs* 基因(*OfUGT85A82*、*OfUGT85A83*、*OfUGT85AF3* 和 *OfUGT85A84*)^[45]。在对 4 个阶段桂花花朵的转录组测序中,分析并鉴定了 2 个候选基因(*OfTPS1* 和 *OfTPS2*),qRT-PCR 结果表明它们在开花期表达量最高,暗示其参与了桂花萜类化合物的合成^[46]。对 30 份不同桂花品种的转录组测序中发现 12 个转录因子在不同桂花品种的芳樟醇合成途径中发挥重要作用^[47]。此外,有些研究不仅鉴定出与花色相关的基因,并且确定了与花香相关的基因。如,在‘早银桂’和‘橙红丹桂’花的转录组测序中共鉴定出 167 个参与花香调控的基因^[38]。在‘金玉台阁’初花期和盛花期花朵转录组测序中,鉴定到 3 个香味合成的基因^[40]。以上研究有助于挖掘桂花花香的关键调控基因,揭示桂花花香的分子调控机制,对今后桂花花香分子育种有一定的指导意义。

2.3 花开放相关转录组测序

根据不同品种的开花习性,桂花开放有一年一次和一年多次 2 种开放型。温度是决定其开花的主要因素^[48]。关于桂花开放的分子研究也有相应报道。如在不同温度(19℃和 23℃)处理下的桂花转录组测序中发现细胞壁代谢、植物激素信号转导通路和转录因子表达水平差异较大,一些基因可能参与了花瓣细胞在开放过程中对相对低温的响应^[49]。此外,分别对‘四季桂’(‘Sijigui’)和‘堰红桂’不同时期的花芽进行转录组测序,其中 3 个基因(*OfFT*、*OfTFL1* 和 *OfBFT*)在花开放过程中有差异表达,进一步的研究表明 *OfSPL8* 是 *OfFT* 和 *OfBFT* 共同的上游转录因子,在连续开花调控中起着重要作用^[50]。上述结果为研究桂花花朵开放的分子机制提供了新的思路。

2.4 叶色相关转录组测序

2012 年,木犀属品种国际登录中心正式确立了彩叶桂品种群,这是继桂花四大品种群之后的第五

个品种群^[5]。目前,桂花叶色的研究主要是以彩叶桂品种为对象,叶色变异的产生通常伴随着叶绿素含量的下降及类胡萝卜素与叶绿素比值的升高。彩叶桂叶色变异的分子机制十分复杂,主要涉及叶绿素代谢、类胡萝卜素代谢和光合作用等途径^[51]。通过分析‘银碧双辉’(*O. fragrans* ‘Yinbi Shuanghui’)不同发育阶段的叶片转录组数据,共有5个基因(*OjHSEA2*、*OjNFYC9*、*OjTCP20*、*OjWRKY3*和*OjWRKY4*)被确定为候选基因^[52]。另有一项关于‘虔南桂妃’(*O. fragrans* ‘Qiannan Guifei’)红色、黄绿色和绿色叶片的转录组学研究表明,7个结构基因(*OjCHS*、*OjCHI*、*OjF3H*、*OjDFR*、*OjANS*、*OjGT*和*Oj3AT*)^[53]在红叶中高度表达,推测它们可能促进了叶片红色的消退^[53]。上述研究为彩叶桂品种叶色形成机制提供了新的认识。

2.5 果实发育相关转录组测序

长期以来,桂花的研究主要集中在花和叶上,对果实的研究较少。在桂花果实发育的过程中,果皮颜色逐渐由绿色变为紫色,果肉质地逐渐软化。研究人员对不同发育阶段(绿色、半绿半紫和全紫色)的桂花果实进行了转录组测序,认为 α -亚麻酸代谢和类胡萝卜素代谢途径可能是桂花果实发育过程中的重要途径;其中*OjLOX*、*OjAOS*和*OjOPR*的上调可能是 α -亚麻酸积累的原因,而*OjZISO*、*OjLCYE*、*OjLCYB*和*OjZEP*下调可能是类胡萝卜素含量降低的原因,从而导致果实颜色逐渐由绿色变为紫色^[54]。这些结果为进一步研究桂花果实发育提供了新的依据。

2.6 其他转录组测序

由于桂花愈伤组织增殖效率低,不定芽分化困难,目前还未成功建立组织培养和再生体系。虽有桂花愈伤组织再分化的相关报道,但一直未能成功复制^[55]。基于此,笔者所在的研究团队选取不同生长阶段的桂花愈伤组织进行了转录组测序,共鉴定了47 340个基因,其中包括1 798个先前未被鉴定的与愈伤组织发育有关的基因^[56]。通过转录组和内源激素含量关联分析,确定了5个关键基因(*OjSRC2*、*OjPP2CD5*、*OjARR1*、*OjPYL3*和*OjEIL3b*),这为桂花愈伤组织增殖的分子机制研究提供了新思路。

综上,通过对桂花花色、花香、花开放、叶色、果实发育等相关性状进行转录组测序,可以快速从特定通路上挖掘出调控桂花重要性状的功能基因,大大缩短了筛选关键基因的试验周期,也为揭示其

作用机制奠定了坚实基础。

3 桂花蛋白组学研究

植物细胞在执行相关生物功能时会表现出一定的规律,而蛋白质组是基因表达的直接产物,有助于揭示植物特殊形态或性状的机制。关于桂花蛋白组学研究相对较少。在桂花花瓣衰老过程中,37.6 kD多肽的表达与花瓣衰老负相关,而63.1、57.5和51.5 kD多肽的表达与花瓣的衰老正相关,暗示了这些蛋白在桂花花瓣衰老中的功能差异^[57]。有研究表明乙烯处理诱导了1条63.4 kD特异性蛋白质条带,暗示可能与衰老有关的基因调控表达相关^[58]。最近一项关于桂花雌蕊蛋白质组学的研究表明,共有428种不同功能的蛋白丰度发生了显著变化,这些差异表达蛋白主要分布在糖代谢、次生代谢和信号级联反应中^[59]。

4 桂花功能基因研究

桂花相关功能基因的研究主要集中在花色和花香方面。研究表明*OjWRKY3*和*OjCCD4*在丹桂和银桂不同花期的花瓣中表达趋势相同,而GUS活性检测表明*OjWRKY3*与*OjCCD4*启动子相互作用,初步揭示了桂花花瓣中 β -紫罗兰酮的生物合成^[60]。另有报道表明转录因子*OjERF61*在桂花花瓣中的表达模式与*OjCCD4*基本一致,酵母单杂交和电泳迁移实验表明,该基因与*OjCCD4*启动子结合,刺激*OjCCD4*表达,从而调控桂花花瓣中 β -紫罗兰酮的合成^[61]。研究人员克隆了基因*OjTPS5*,烟草瞬时表达显示*OjTPS5*可催化形成芳樟醇,由此推测其在桂花萜类香气形成中发挥重要作用^[62]。对*OjMYB1R47*瞬时超量表达本氏烟草并测定挥发性物质,结果表明 β -紫罗兰酮等芳香物的含量均发生了明显变化^[63]。最近的研究表明,桂花R2R3-MYB转录因子*OjMYB21*与芳樟醇合成酶基因*OjTPS2*具有高度的协同作用,相关实验表明,*OjMYB21*直接结合*OjTPS2*启动子并激活其表达,对芳樟醇的生物合成起到正向调节作用^[64]。此外,将基因*OjNCED3*稳定转化烟草,阳性植株中类胡萝卜素含量显著低于对照,同时通路上相关基因的表达量明显上调,表明*OjNCED3*能降解类胡萝卜素,从而使桂花花瓣的颜色发生变化^[65]。

关于花色^[66-67]、花香^[68-69]和低温调控^[70-71]的信号通路均有报道, 基于现有数据初步绘制了桂花相关信号通路。其中, 桂花花色主要是类胡萝卜素代谢途径。首先 GGPP 在 PSY 酶的作用下形成八氢番茄红素, 接着在 LCY 的作用下合成叶黄素和玉米黄素, 而玉米黄素和 β -类胡萝卜素在 CCD 的催化下最终形成脱辅基类胡萝卜素, 这一过程可能由 *OfERF61*、*OfWRKY3* 和 *OfMYB43* 调控(图 1: A)。桂花花香主要是单萜类物质, 而萜类物质的合成途径主要是 MEP 途径。MEP 途径涉及多步酶促反应, 首先磷酸烯醇式丙酮酸+4-磷酸赤藓糖合成 3-磷酸甘油醛+丙酮酸, 接着在 DXS 和 DXR 的作用下生成 IPP, IPP 在 GPPS 的作用下形成 GPP, 最后在 TPS

的作用下形成单萜, 这一过程可能由 *OfMYB1* 等多个基因调控(图 1: B)。桂花逆境方面的研究很少, 主要是低温, 涉及 ABA 通路。首先 ABA 合成 ABA 受体蛋白(PYB、PYL 和 RCAR), 接着这些受体蛋白在 PP2C 的催化下合成 SnRK2, 这一过程可能由 *OfbHLH120* 等多个基因调控(图 1: C)。

5 展望

桂花是我国特有的观赏植物, 四季长青, 花香醉人, 具有广阔的发展前景。桂花分子生物学研究起步较晚, 虽已在花色、花香、叶色等方面取得诸多进展, 但仍有许多问题亟待解决。主要表现在:

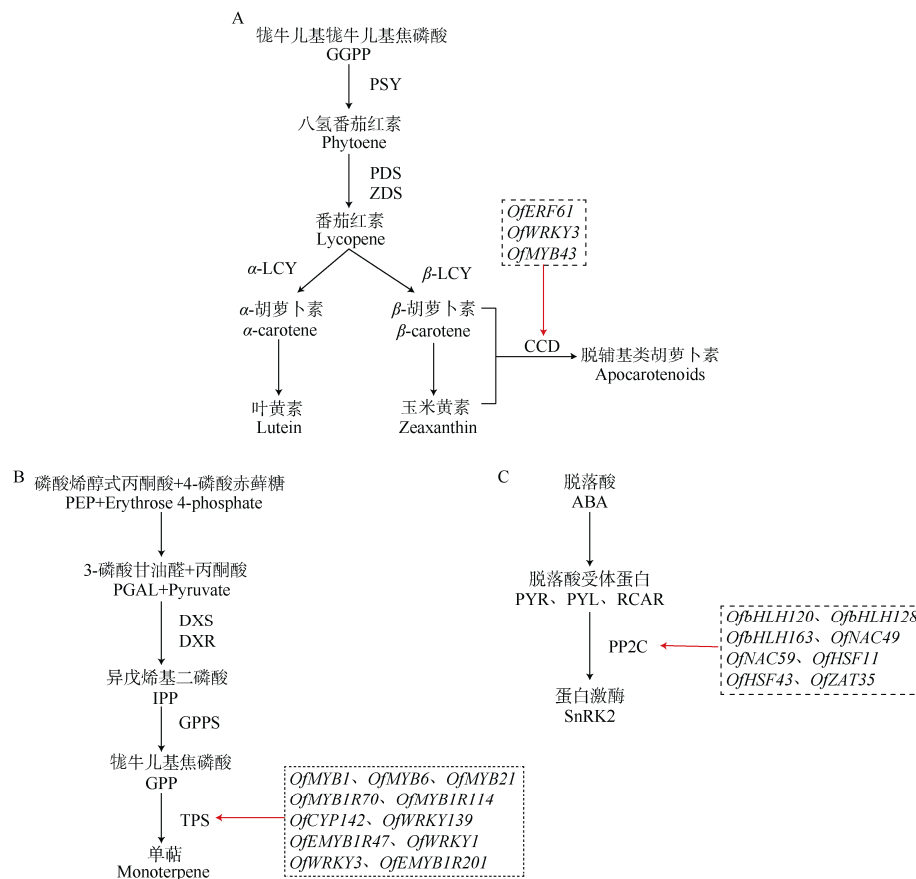


图 1 桂花相关性状信号通路。A: 花色; B: 花香; C: 低温; PSY: 八氢番茄红素合酶; PDS: 八氢番茄红素去饱和酶; ZDS: ζ -胡萝卜素去饱和酶; α -LCY: 番茄红素 α -环化酶; β -LCY: 番茄红素 β -环化酶; CCD: 类胡萝卜素切割双加氧酶; DXS: 5-磷酸脱氧木酮糖合成酶; DXR: 5-磷酸脱氧木酮糖还原异构酶; GPPS: 牻牛儿苗基焦磷酸合酶; TPS: 萜类合酶; PYR: 4-溴-N-(2-吡啶甲基)-1-萘磺酰胺抗性; PYL: 类似 4-溴-N-(2-吡啶甲基)-1-萘磺酰胺抗性; RCAR: ABA 受体调控组分; PP2C: 2C 型蛋白磷酸酶。

Fig. 1 Signal pathway of *Osmanthus fragrans* related traits. A: Flower coloration; B: Floral scent; C: Cryogenic; PSY: Phytoene synthase; PDS: Phytoene desaturase; ZDS: ζ -Carotene desaturase; α -LCY: Lycopene α -cyclase; β -LCY: Lycopene β -cyclase; CCD: Carotenoid cleavage dioxygenase; DXS: 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase; DXR: 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase; GPPS: Geranyl pyrophosphate synthase; TPS: Terpene synthase; PYR: Pyrabactin resistance; PYL: Pyrabactin resistance-like; RCAR: Regulatory component of ABA receptors; PP2C: Type 2C protein phosphatases.

一是桂花品种多, 目前仅有‘日香桂’和‘柳叶金桂’公布了全基因组, 而其它桂花品种全基因组测序工作的完成更有助于破译桂花的起源与进化问题; 二是桂花组学研究的相关报道以转录组居多, 关于其他组学或多组学联合分析仅零星报道, 多组学联合分析可以更好地阐明桂花相关性状的分子机制; 三是桂花高效稳定的遗传转化体系还未建立, 导致一些优异基因只能在模式植物中进行功能验证。虽然功能基因在模式植物中的功能验证可以解析内在的调控机制, 但桂花本源的基因功能验证更具有说服力; 四是桂花相关性状(观赏性状和抗逆性状)的分子调控机制研究不够深入, 仍需加强研究。

目前, 分子生物学工程相关技术已较为成熟, 桂花分子生物学相关研究已奠定基础。今后的桂花研究应注重挖掘重要优异基因、突破高效生物育种关键技术、选育突破性新品种和完善分子调控机制这几个方面, 从而更好地发挥其应用价值。

参考文献

- [1] XIANG Q B, LIU Y L. An Illustrated Monograph of the Sweet *Osmanthus* Cultivars in China [M]. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Publishing House, 2008: 2–15. [向其柏, 刘玉莲. 中国桂花品种图志 [M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2008: 2–15.]
- [2] GU H, LI L, OUYANG Q X, et al. Effects of salt stress on the growth and physiological characteristics of three sweet *Osmanthus fragrans* varieties [J]. Chin Wild Plant Resour, 2020, 39(10): 28–34. [顾恒, 李玲, 欧阳绮霞, 等. 盐胁迫对3个桂花品种生长和生理特性的影响 [J]. 中国野生植物资源, 2020, 39(10): 28–34. doi: 10.3969/j.issn. 1006-9690.2020.10.005.]
- [3] YANG D, XU G, ZOU Y, et al. Advances on the chemical components and bioactivities of *Osmanthus fragrans* fruits [J]. Chin Wild Plant Resour, 2021, 40(6): 47–52. [杨丹, 徐广, 邹艳, 等. 桂花果主要化学成分及生物活性研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2021, 40(6): 47–52. doi: 10.3969/j.issn.1006-9690.2021.06.009.]
- [4] LIU Y L. Preliminary study of sweet osmanthus in Nanjing area [J]. J Nanjing Inst For, 1985(1): 30–37. [刘玉莲. 南京地区桂花栽培品种调查研究 [J]. 南京林学院学报, 1985(1): 30–37.]
- [5] ZANG D K, XIANG Q B, LIU Y L, et al. The studying history and the application to international cultivar registration authority of sweet osmanthus (*Osmanthus fragrans* Lour.) [J]. J Plant Resour Environ, 2003, 12(4): 49–53. [臧德奎, 向其柏, 刘玉莲, 等. 中国桂花的研究历史、现状与桂花品种国际登录 [J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(4): 49–53. doi: 10.3969/j.issn.1674-7895.2003.04.011.]
- [6] XIANG M, DUAN Y F, XIANG Q B. Establishment of a new group: *Osmanthus fragrans* colour group [J]. J Nanjing For Univ (Nat Sci), 2014, 38(1): 2. [向民, 段一凡, 向其柏. 木犀属品种国际登录中心年报(1) 彩叶桂品种群的建立 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2014, 38(1): 2.]
- [7] YANG X L, HAO Q M. Dormancy and germination of *Osmanthus fragrans* seeds [J]. J Zhejiang For Coll, 2010, 27(2): 272–276. [杨秀莲, 郝其梅. 桂花种子休眠和萌发的初步研究 [J]. 浙江林学院学报, 2010, 27(2): 272–276. doi: 10.3969/j.issn.2095-0756.2010.02.018.]
- [8] YANG X L, MU H N, HAO L Y, et al. Photosynthetic response of three *Osmanthus fragrans* cultivars to NaCl stress [J]. J Henan Agric Univ, 2015, 49(2): 195–198. [杨秀莲, 母洪娜, 郝丽媛, 等. 3个桂花品种对NaCl胁迫的光合响应 [J]. 河南农业大学学报, 2015, 49(2): 195–198. doi: 10.16445/j.cnki.1000-2340.2015.02.011.]
- [9] YANG X L, SHI T T, WEN A L, et al. Variance analysis of aromatic components from different varieties of *Osmanthus fragrans* [J]. J NE For Univ, 2015, 43(1): 83–87. [杨秀莲, 施婷婷, 文爱林, 等. 不同桂花品种香气成分的差异分析 [J]. 东北林业大学学报, 2015, 43(1): 83–87. doi: 10.13759/j.cnki.dlxb.20141226.029.]
- [10] SHI T T, YANG X L, WANG L G. Dynamic characteristics of floral components and anatomical observation of petals in three cultivars of *Osmanthus fragrans* [J]. J Nanjing For Univ (Nat Sci), 2020, 44(4): 12–20. [施婷婷, 杨秀莲, 王良桂. 3个桂花品种花香组分动态特征及花被片结构解剖学观测 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2020, 44(4): 12–20. doi: 10.3969/j.issn.1000-2006.202003047.]
- [11] The *Arabidopsis* Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* [J]. Nature, 2000, 408(6814): 796–815. doi: 10.1038/35048692.
- [12] YANG X L, YUE Y Z, LI H Y, et al. The chromosome-level quality genome provides insights into the evolution of the biosynthesis genes for aroma compounds of *Osmanthus fragrans* [J]. Hort Res, 2018, 5(1): 72. doi: 10.1038/s41438-018-0108-0.
- [13] CHEN H G, ZENG X L, YANG J, et al. Whole-genome resequencing of *Osmanthus fragrans* provides insights into flower color evolution [J]. Hort Res, 2021, 8: 98. doi: 10.1038/s41438-021-00531-0.
- [14] DING W J, OUYANG Q X, LI Y L, et al. Genome-wide investigation of WRKY transcription factors in sweet osmanthus and their potential regulation of aroma synthesis [J]. Tree Physiol, 2020, 40(4): 557–572. doi: 10.1093/treephys/tpz129.
- [15] YAN X, DING W J, WU X Y, et al. Insights into the MYB-related transcription factors involved in regulating floral aroma synthesis in sweet osmanthus [J]. Front Plant Sci, 2022, 13: 765213. doi: 10.3389/fpls.2022.765213.

- [16] LIU J W, HU H M, SHEN H M, et al. Insights into the cytochrome P450 monooxygenase superfamily in *Osmanthus fragrans* and the role of *OfCYP142* in linalool synthesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(20): 12150. doi: 10.3390/ijms232012150.
- [17] TIAN L Y, HUANG X Z. Application value of protein phase separation mechanism of flowering regulation in de novo domestication [J]. *Hereditas*, 2023, 45(9): 754–764. [田璐妍, 黄小珍. 植物开花调控中蛋白质相分离机制在从头驯化中的应用价值 [J]. *遗传*, 2023, 45(9): 754–764. doi: 10.16288/j.ycz.23-165.]
- [18] WANG Y D, ZHANG T, WANG R C, et al. Recent advances in auxin research in rice and their implications for crop improvement [J]. *J Exp Bot*, 2018, 69(2): 255–263. doi: 10.1093/jxb/erx228.
- [19] HE Y M, ZHANG F. Study of regulating effect of auxin on floret opening in rice [J]. *Acta Agron Sin*, 2023, 49(6): 1690–1698. [何永明, 张芳. 生长素调控水稻颖花开放的效应研究 [J]. *作物学报*, 2023, 49(6): 1690–1698. doi: 10.3724/SP.J.1006.2023.22027.]
- [20] CHEN G W, YUE Y Z, LI L, et al. Genome-wide identification of the auxin response factor (*ARF*) gene family and their expression analysis during flower development of *Osmanthus fragrans* [J]. *Forests*, 2020, 11(2): 245. doi: 10.3390/f11020245.
- [21] YANG Y, MIAO Y F, ZHONG S W, et al. Genome-wide identification and expression analysis of *XTH* gene family during flower-opening stages in *Osmanthus fragrans* [J]. *Plants*, 2022, 11(8): 1015. doi: 10.3390/plants11081015.
- [22] ZHANG Y, WANG J X, CAI X, et al. Identification and expression of *OfACOs* gene family in *Osmanthus fragrans* [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2023, 40(3): 492–501. [张耀, 王家璇, 蔡璇, 等. 桂花 *OfACOs* 基因家族鉴定及表达分析 [J]. *浙江农林大学学报*, 2023, 40(3): 492–501. doi: 10.11833/j.issn.2095-0756.20220783.]
- [23] YOU Y, ZHANG X Y. Effects of low temperature on mesophyll cell ultrastructure of *Osmanthus fragrans* ‘Wandian Jin’ [J]. *Acta Sci Nat Univ Sunyatseni*, 2021, 60(4): 34–41. [尤扬, 张晓云. 低温对桂花万点金叶肉细胞超微结构的影响 [J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2021, 60(4): 34–41. doi: 10.13471/j.cnki.acta.snus.2020.03.06.2020E004.]
- [24] MU H N, WANG W, FAN L, et al. Effects of *Piriformospora indica* on growth and drought resistance in *Osmanthus fragrans* under water deficit stress [J]. *J Nanjing For Univ (Nat Sci)*, 2023, 47(2): 101–106. [母洪娜, 王炜, 樊蕾, 等. 印度梨形孢对干旱胁迫下桂花生长及抗旱性的影响 [J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2023, 47(2): 101–106.]
- [25] LI X, GAO S T, WU H, et al. Impacts of NaCl stress on ion absorption and transportation of three *Osmanthus* cultivars [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2022, 50(23): 116–122. [李霞, 高树桃, 吴红, 等. NaCl 胁迫对 3 个桂花品种离子吸收和运输的影响 [J]. *江苏农业科学*, 2022, 50(23): 116–122. doi: 10.15889/j.issn.1002-1302.2022.23.017.]
- [26] LI Y L, LI L, DING W J, et al. Genome-wide identification of *Osmanthus fragrans* bHLH transcription factors and their expression analysis in response to abiotic stress [J]. *Environ Exp Bot*, 2020, 172: 103990. doi: 10.1016/j.envexpbot.2020.103990.
- [27] YUE Y Z, LI L, LI Y L, et al. Genome-wide analysis of NAC transcription factors and characterization of the cold stress response in sweet osmanthus [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2020, 38(2): 314–330. doi: 10.1007/s11105-020-01195-1.
- [28] BIN J, ZHU M L, DING H F, et al. New insights into the roles of *Osmanthus fragrans* heat-shock transcription factors in cold and other stress responses [J]. *Horticulturae*, 2022, 8(1): 80. doi: 10.3390/horticulturae8010080.
- [29] DING H F, YANG Z D, ZAI Z Y, et al. Genome-wide analysis of *ZAT* gene family in *Osmanthus fragrans* and the function exploration of *OfZAT35* in cold stress [J]. *Plants*, 2023, 12(12): 2346. doi: 10.3390/plants12122346.
- [30] ZHU M L, BIN J, DING H F, et al. Insights into the trihelix transcription factor responses to salt and other stresses in *Osmanthus fragrans* [J]. *BMC Genom*, 2022, 23(1): 334. doi: 10.1186/s12864-022-08569-7.
- [31] YE Y, CAO S S, SHEN L X, et al. Comparative transcriptome analysis of CCCH family in roles of flower opening and abiotic stress in *Osmanthus fragrans* [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(23): 15363. doi: 10.3390/ijms232315363.
- [32] LIU G H, GU H, CAI H Y, et al. Integrated transcriptome and biochemical analysis provides new insights into the leaf color change in *Acer fabri* [J]. *Forests*, 2023, 14(8): 1638. doi: 10.3390/f14081638.
- [33] YANG J J, GUO Z H, ZHANG Y T, et al. Transcriptomic profiling of *Cryptomeria fortunei* Hooibrenk vascular cambium identifies candidate genes involved in phenylpropanoid metabolism [J]. *Forests*, 2020, 11(7): 766. doi: 10.3390/f11070766.
- [34] ZHANG H J, CHEN J F, ZHANG F, et al. Transcriptome analysis of callus from melon [J]. *Gene*, 2019, 684: 131–138. doi: 10.1016/j.gene.2018.10.037.
- [35] LIU Y L. Cultivar classification of *Osmanthus fragrans* Lour. and the development of germplasm resources of *Osmanthus* Lour. [J]. *J Plant Resour Environ*, 1993, 2(2): 44–48. [刘玉莲. 桂花品种分类及木犀属种质资源的利用 [J]. *植物资源与环境*, 1993, 2(2): 44–48.]
- [36] MU H N, SUN T Z, YANG X L, et al. Differential expression of flower color related genes of *Osmanthus fragrans* Lour. ‘Chenghongdangui’ and ‘Zaoyingui’ [J]. *J Nanjing For Univ (Nat Sci)*, 2015, 39(3): 183–

186. [母洪娜, 孙陶泽, 杨秀莲, 等. 两个桂花品种花色色素相关基因的差异表达 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2015, 39(3): 183–186. doi: 10.3969/j.issn.1000-2006.2015.03.033.]
- [37] TIAN Q Y, YUE Y Z, SHEN H M, et al. Research progress in the regulation of carotenoid metabolism in plant ornamental organs [J]. Biotechnol Bull, 2022, 38(12): 35–46. [田清尹, 岳远征, 申慧敏, 等. 植物观赏器官中类胡萝卜素代谢调控的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2022, 38(12): 35–46. doi: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2022-0095.]
- [38] MU H N, LI H G, WANG L G, et al. Transcriptome sequencing and analysis of sweet osmanthus (*Osmanthus fragrans* Lour.) [J]. Genes Genom, 2014, 36(6): 777–788. doi: 10.1007/s13258-014-0212-y.
- [39] ZHANG C, WANG Y G, FU J X, et al. Transcriptomic analysis and carotenogenic gene expression related to petal coloration in *Osmanthus fragrans* ‘Yanhong Gui’ [J]. Trees, 2016, 30(4): 1207–1223. doi: 10.1007/s00468-016-1359-8.
- [40] XIAN X L, PAN Y Z, CHEN R, et al. Comparative transcriptome analysis of *Osmanthus fragrans* between initial flowering stage and full-blooming stage [J]. Genom Appl Biol, 2020, 39(3): 1208–1214. [鲜小林, 潘远智, 陈睿, 等. 初花期和盛花期的桂花比较转录组分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(3): 1208–1214. doi: 10.13417/j.gab.039.001208.]
- [41] ZHANG Q, LI Y R, ZHANG R Z, et al. Transcriptome and carotenoids profiling of flowers in different *Osmanthus fragrans* cultivars provide insight into transcriptional control network of carotenoid-related genes expression [J]. Sci Hort, 2022, 303: 111201. doi: 10.1016/j.scienta.2022.111201.
- [42] YANG X L, SHI T T, WEN A L, et al. Analysis of volatile compounds from petals of three species *Osmanthus fragrans* asiaticus group cultivars by gas chromatography-mass spectrometry [J]. J CS Univ For Technol, 2015, 35(10): 127–133. [杨秀莲, 施婷婷, 文爱林, 等. 3个四季桂品种花瓣挥发性成分的 GC-MS 分析 [J]. 中南林业科技大学学报, 2015, 35(10): 127–133. doi: 10.14067/j.cnki.1673-923x.2015.10.022.]
- [43] ZOU J J, CAI X, ZENG X L, et al. Changes of aroma-active compounds in different cultivars of *Osmanthus fragrans* during flowering [J]. Acta Hort Sin, 2017, 44(8): 1517–1534. [邹晶晶, 蔡璇, 曾祥玲, 等. 桂花不同品种开花过程中香气活性物质的变化 [J]. 园艺学报, 2017, 44(8): 1517–1534. doi: 10.16420/j.issn.0513-353x.2017-0050.]
- [44] YANG X L, LI H Y, YUE Y Z, et al. Transcriptomic analysis of the candidate genes related to aroma formation in *Osmanthus fragrans* [J]. Molecules, 2018, 23(7): 1604. doi: 10.3390/molecules23071604.
- [45] ZHENG R R, ZHU Z Y, WANG Y L, et al. *UGT85A84* catalyzes the glycosylation of aromatic monoterpenes in *Osmanthus fragrans* Lour. flowers [J]. Front Plant Sci, 2019, 10: 1376. doi: 10.3389/fpls.2019.01376.
- [46] XIONG R, CHEN Z, WANG W Y, et al. Combined transcriptome sequencing and prokaryotic expression to investigate the key enzyme in the 2-C-methylerythritol-4-phosphate pathway of *Osmanthus fragrans* [J]. Funct Plant Biol, 2020, 47(10): 945–958. doi: 10.1071/FP19365.
- [47] YUE Y Z, SHI T T, LIU J W, et al. Genomic, metabonomic and transcriptomic analyses of sweet osmanthus varieties provide insights into floral aroma formation [J]. Sci Hort, 2022, 306: 111442. doi: 10.1016/j.scienta.2022.111442.
- [48] YAO Y F, DONG B, FENG C Y, et al. Identification of the R2R3-MYB family of *Osmanthus fragrans* and its expression in the process of flower opening [J]. Acta Hort Sin, 2020, 47(10): 2027–2039. [姚亦凡, 董彬, 冯成庸, 等. 桂花 R2R3-MYB 家族基因鉴定及其在花开过程中的表达分析 [J]. 园艺学报, 2020, 47(10): 2027–2039. doi: 10.16420/j.issn.0513-353x.2020-0023.]
- [49] FU J X, ZHANG C, LIU Y C, et al. Transcriptomic analysis of flower opening response to relatively low temperatures in *Osmanthus fragrans* [J]. BMC Plant Biol, 2020, 20(1): 337. doi: 10.1186/s12870-020-02549-3.
- [50] WANG Q Q, GAO G, CHEN X, et al. Genetic studies on continuous flowering in woody plant *Osmanthus fragrans* [J]. Front Plant Sci, 2022, 13: 1049479. doi: 10.3389/fpls.2022.1049479.
- [51] CHEN X, XIE J, YUE Y Z, et al. Advances in research on leaf coloration mechanism of colored leaf plants [J]. Acta Bot Boreali-Occid Sin, 2020, 40(2): 358–364. [陈璇, 谢军, 岳远征, 等. 彩叶植物叶片呈色分子机制研究进展 [J]. 西北植物学报, 2020, 40(2): 358–364. doi: 10.7606/j.issn.1000-4025.2020.02.0358.]
- [52] CHEN X, YANG X L, XIE J, et al. Biochemical and comparative transcriptome analyses reveal key genes involved in major metabolic regulation related to colored leaf formation in *Osmanthus fragrans* ‘Yinbi Shuanghui’ during development [J]. Biomolecules, 2020, 10(4): 549. doi: 10.3390/biom10040549.
- [53] CUI Q, HUANG J H, WU F, et al. Biochemical and transcriptomic analyses reveal that critical genes involved in pigment biosynthesis influence leaf color changes in a new sweet osmanthus cultivar ‘Qian-nan Guifei’ [J]. PeerJ, 2021, 9: e12265. doi: 10.7717/peerj.12265.
- [54] MA C C, ZHANG C, WANG X Y, et al. Alternative splicing analysis revealed the role of alpha-linolenic acid and carotenoids in fruit development of *Osmanthus fragrans* [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(10): 8666. doi: 10.3390/ijms24108666.
- [55] ZOU J J, YUAN B, GAO W, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of *Osmanthus fragrans*

- [C]// Proceedings of the Advances in Ornamental Horticulture of China. Beijing: China Forestry Publishing House, 2015: 238–242. [邹晶晶, 袁斌, 高微, 等. 桂花未成熟合子胚诱导体细胞胚再生 [C]// 中国观赏园艺研究进展. 北京: 中国林业出版社, 2015: 238–242.]
- [56] GU H, DING W J, SHI T T, et al. Integrated transcriptome and endogenous hormone analysis provides new insights into callus proliferation in *Osmanthus fragrans* [J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 7609. doi: 10.1038/s41598-022-11801-9.
- [57] XU X F. Studies on the protein changes during petal senescence of *Osmanthus fragrans* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2003. [徐幸福. 桂花切花花瓣衰老过程中的蛋白质变化分析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2003.]
- [58] ZHOU Y. Researches on characters and mechanism of programmed cell death (PCD) during the petal senescence in *Osmanthus fragrans* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2008. [周媛. 桂花花瓣衰老过程中细胞程序性死亡特征与机制研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.]
- [59] DUAN Y F, ZHANG C, ZHANG M, et al. SWATH-MS based quantitative proteomics reveal regulatory metabolism and networks of androdioecy breeding system in *Osmanthus fragrans* [J]. BMC Plant Biol, 2021, 21(1): 468. doi: 10.1186/s12870-021-03243-8.
- [60] HAN Y J, WU M, CAO L Y, et al. Characterization of *OfWRKY3*, a transcription factor that positively regulates the carotenoid cleavage dioxygenase gene *OfCCD4* in *Osmanthus fragrans* [J]. Plant Mol Biol, 2016, 91(4/5): 485–496. doi: 10.1007/s11103-016-0483-6.
- [61] HAN Y J, WANG H Y, WANG X D, et al. Mechanism of floral scent production in *Osmanthus fragrans* and the production and regulation of its key floral constituents, β -ionone and linalool [J]. Hort Res, 2019, 6: 106. doi: 10.1038/s41438-019-0189-4.
- [62] LIU C, XIE W, YUAN J M, et al. Molecular cloning and functional characterization of linalool synthase gene *OfTPS5* in *Osmanthus fragrans* ‘Lianzi Dangu’ flowers [J]. Acta Hort Sin, 2020, 47(2): 310–320. [刘偲, 席婉, 袁金梅, 等. 桂花‘莲籽丹桂’芳樟醇合酶基因 *OfTPS5* 的克隆及功能鉴定 [J]. 园艺学报, 2020, 47(2): 310–320. doi: 10.16420/j.issn.0513-353x.2019-0721.]
- [63] YUE Y Z, HU H M, LIU J W, et al. Functional analysis of *OfMYB1R47* transcription factor in *Osmanthus fragrans* during the formation of aromatic volatiles [J]. J Zhejiang A&F Univ, 2023, 40(3): 465–474. [岳远征, 胡宏敏, 刘家伟, 等. 桂花 *OfMYB1R47* 转录因子在芳香挥发物形成过程中的功能分析 [J]. 浙江农林大学学报, 2023, 40(3): 465–474. doi: 10.11833/j.issn.2095-0756.20220456.]
- [64] LAN Y G, ZHANG K M, WANG L N, et al. The R2R3-MYB transcription factor *OfMYB21* positively regulates linalool biosynthesis in *Osmanthus fragrans* flowers [J]. Int J Biol Macromol, 2023, 249: 126099. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.126099.
- [65] DU Y X, WANG Y G, XIAO Z, et al. Ectopic overexpression of *OfNCED3* regulates the synthesis of carotenoids and chlorophylls in transgenic tobacco leaves [J]. Acta Hort Sin, 2023, 50(6): 1284–1294. [杜艳霞, 王艺光, 肖政, 等. 桂花 *OfNCED3* 调控转基因烟草叶片类胡萝卜素和叶绿素的合成 [J]. 园艺学报, 2023, 50(6): 1284–1294. doi: 10.16420/j.issn.0513-353x.2022-0330.]
- [66] ZHOU X J, WELSCH R, YANG Y, et al. *Arabidopsis* OR proteins are the major posttranscriptional regulators of phytoene synthase in controlling carotenoid biosynthesis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(11): 3558–3563. doi: 10.1073/pnas.1420831112.
- [67] ARIAS D, ORTEGA A, GONZÁLEZ-CALQUIN C, et al. Development and carotenoid synthesis in dark-grown carrot taproots require *PHYTOCHROME RAPIDLY REGULATED* [J]. Plant Physiol, 2022, 189(3): 1450–1465. doi: 10.1093/plphys/kiac097.
- [68] BYERS K J R P, BRADSHAW H D JR, RIFFELL J A. Three floral volatiles contribute to differential pollinator attraction in monkeyflowers (*Mimulus*) [J]. J Exp Biol, 2014, 217(4): 614–623. doi: 10.1242/jeb.092213.
- [69] MUHLEMANN J K, KLEMPIEN A, DUDAREVA N. Floral volatiles: From biosynthesis to function [J]. Plant Cell Environ, 2014, 37(8): 1936–1949. doi: 10.1111/pce.12314.
- [70] VISHWAKARMA K, UPADHYAY N, KUMAR N, et al. Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: A review on current knowledge and future prospects [J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 161. doi: 10.3389/fpls.2017.00161.
- [71] ZHANG Q, KONG X G, YU Q, et al. Responses of PYR/PYL/RCAR ABA receptors to contrasting stresses, heat and cold in *Arabidopsis* [J]. Plant Sign Behav, 2019, 14(12): 1670596. doi: 10.1080/15592324.2019.1670596.