

植物黄烷酮-3-羟化酶基因研究进展

段玥彤^{1, 2, 3} 王鹏年^{1, 3} 张春宝^{1, 3} 林春晶^{1, 2, 3}

(1. 吉林省农业科学院大豆研究所, 长春 130033; 2. 吉林农业大学农学院, 长春 130018; 3. 大豆国家工程研究中心, 长春 130033)

摘要: 黄烷酮 3-羟化酶 (flavanone 3-hydroxylase, *F3H*) 作为植物进入不同类黄酮代谢物分支的一个中枢酶, 可以催化生成花青素和黄酮醇合成的共同前体物质二氢黄酮醇, 在类黄酮合成途径中起着十分重要的调控作用。本文从 *F3H* 基因的发现、结构功能和表达调控等方面, 综述了 *F3H* 基因在调节植物花青素和黄酮醇合成中的研究进展及调控网络, 并对未来研究方向进行了展望。期望为 *F3H* 基因在植物类黄酮代谢合成途径的调控机制研究提供参考, 也有助于利用 *F3H* 开展基因工程研究, 定向培育植物新种质。

关键词: *F3H*; 类黄酮; 花青素; 代谢调控

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2021-1253

Research Progress in Plant Flavanone-3-hydroxylase Gene

DUAN Yue-tong^{1, 2, 3} WANG Peng-nian^{1, 3} ZHANG Chun-bao^{1, 3} LIN Chun-jing^{1, 2, 3}

(1. Soybean Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033; 2. College of Agriculture, Jilin Agricultural University, Changchun 130018; 3. National Soybean Engineering Technology Research Center, Changchun 130033)

Abstract: Flavanone 3-hydroxylase (*F3H*), as a central enzyme for plants to enter the branch of different flavonoid metabolites, can generate dihydroflavonol, a common precursor substance for the synthesis of anthocyanins and flavonols, and it plays a very important regulatory role in the synthesis of flavonoids. From the discovery, structure, function, and expression regulation of the *F3H* gene, this article reviews the research progress and regulation network of *F3H* gene in regulating the synthesis of anthocyanins and flavonols, and prospects the future direction. It is aimed to provide a reference for understanding the regulation mechanism of *F3H* gene on the metabolic synthesis pathway of plant flavonoids, and also help researchers to use *F3H* with genetic engineering method to obtain the new plant germplasm via directive breeding.

Key words: *F3H*; flavonoids; anthocyanin; metabolic regulation

类黄酮 (flavonoids) 又称黄酮类化合物, 是植物中重要的多酚类次生代谢产物, 具有多种重要的生理功能。大量研究表明, 类黄酮控制着植物的花色形成、紫外保护、抵御病原微生物侵染以及与其共生微生物的信号作用^[1-2], 并具有消炎、抗氧化及清除自由基等多种药用价值^[3-4]。黄烷酮 3-羟化酶 (flavanone 3-hydroxylase, *F3H*) 是类黄酮代谢途径上的一个关键酶, 可以催化柚皮素发生反应生成二氢黄酮醇, 二氢黄酮醇是黄酮醇和花青素合成的共

同前体物质。因此, *F3H* 基因的表达一方面对植物花色有着重要影响, 另一方面影响着植物中黄酮醇的合成途径。

1 *F3H* 概述

1.1 *F3H* 的发现

1991 年 Martin 等^[5] 在研究金鱼草 (*Antirrhinum majus*) 花色苷合成调控中, 发现 *F3H* 突变会阻断花青素合成途径, 导致生成白花。之后在矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 中克隆了 *F3H* 基因并在大肠杆

收稿日期: 2021-09-28

基金项目: 中央引导地方科技发展资金基础研究专项 (202002070JC), 吉林省农业科技创新工程基金 (CXGC2021RCY020), 国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-04)

作者简介: 段玥彤, 女, 硕士研究生, 研究方向: 大豆杂种优势利用和分子机理; E-mail: duanyuetong@163.com

通讯作者: 林春晶, 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 大豆杂种优势利用和分子机理; E-mail: lincj@cjaas.com

菌中进行功能表达^[6]。现今,已经从苹果 (*Malus pumila* Mill.)^[7]、葡萄 (*Vitis vinifera* L.)^[8]、玉米 (*Zea mays* L.)^[9]、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[10]、大豆 (*Glycine max*)^[11]、红花 (*Carthamus tinctorius* L.)^[12]、百合 (*Lilium* spp.)^[13] 等多种植物中克隆得到 *F3H* 基因。在大多数植物体内, *F3H* 基因以单拷贝形式存在^[9-10], 在大豆、小麦 (*Triticum aestivum* L.) 和紫苏 (*Perilla frutescens*) 中则含有 2-4 个拷贝^[14]。

1.2 *F3H* 的结构

黄烷酮 3-羟化酶属于 2-酮戊二酸依赖性双加氧酶 (2-ODD) 家族, 其基因结构和蛋白结构都高度保守, 具有较强的底物特异性, 需要 Fe^{2+} 和氧化戊二酸等辅助因子来催化反应^[15], 对 *F3H* 的氨基酸序列进行分析发现, 包含 2-ODD 家族特有的保守氨基酸位点组氨酸 His218、His276、天冬氨酸 Asp220、精氨酸 Arg286 和丝氨酸 Ser288, 可以促进 *F3H* 的活性^[16]。在渝紫薯 7 号 (*Ipomoea batatas* L.) 的 *F3H* 基因蛋白中, 具有与酮戊二酸结合的 RXS 基序 Arg287-Ser285, 以及能结合 Fe^{2+} 的 His219、Asp221 和 His277^[17]。通过对白花茶树 (*Camellia sinensis*) *CsF3H*、黄花金花茶 *CnF3H* 和红花浙江红山茶 *CcF3H* 三个基因进行序列比对并对其保守结构域分析发现, 除以上位点外, 3 个 *F3H* 蛋白的保守结构域中存在一个差异位点, *CcF3H* 由异亮氨酸 Ile200 变异为缬氨酸 Val200^[18], 在茶属 *F3H* 蛋白中 Val200 相对保守。

2 *F3H* 参与花青素合成的研究

2.1 合成路径

F3H 能够催化黄烷酮羟基化生成二氢黄酮醇, 是花青素生物合成途径中的一个关键酶^[19]。植物花青素合成途径是类黄酮合成途径的一个分支, 相关研究较为成熟^[20], 可分为 3 个阶段, 第一阶段为苯丙氨酸 (phenylalanine) 在苯丙氨酸裂解酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL)、肉桂酸羟化酶 (cinnamate 4-hydroxylase, C4H) 和 4-香豆酸辅酶 A 连接酶 (4-coumarate CoA ligase, 4CL) 催化下生成 p-香豆酰辅酶 A, 同时乙酸 (acetic acid) 在乙酰辅酶 A 连接酶 (acetyl-CoA ligase, ACL) 和乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl-CoA carboxylase, ACC) 的

作用下生成丙二酰辅酶 A; 第二阶段为 p-香豆酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 受查尔酮合成酶 (chalcone synthase, CHS) 和查尔酮异构酶 (chalcone isomerase, CHI) 调控, 生成柚皮素 (naringenin), 柚皮素在黄烷酮 3-羟化酶的作用下生成二氢山萘酚 (dihydrokaempferol, DHK)。然后类黄酮 3'-羟化酶 (flavonoid 3'-hydroxylase, F3'H) 和类黄酮 3',5'-羟化酶 (F3'5'H) 在 DHK 的不同位点进行羟基化, 分别形成二氢槲皮素 (dihydroquercetin, DHQ) 和二氢杨梅素 (dihydromyricetin, DHM)^[20]; 第三阶段为 DHK、DHQ、DHM 三种产物在二氢黄酮醇 4-还原酶 (dihydroflavonol 4-reductase, DFR)、花青素苷合成酶 (anthocyanidin synthase, ANS) 和类黄酮 3-O-葡萄糖基转移酶 (flavonoid-3-O-glucosyltransferase, 3GT) 的催化作用下形成稳定的花青苷; 也可以被无色花青素还原酶 (leucoanthocyanidins reductase, LAR) 和花青素还原酶 (anthocyanidins reductase, ANR) 催化形成原花青素^[21]。花青素不稳定一般以花青苷和原花青素的形式存在。

2.2 调节花色

F3H 在植物开花期的高表达, 将增加花青素的积累, 从而影响花朵颜色。在矮牵牛中 *F3H* 基因突变失活可阻断花色素的合成通路, 从而产生白花^[6]; 利用反义 RNA 技术对香石竹 (*Dianthus caryophyllus* L.) *F3H* 基因进行抑制, 使花色由橙红色变淡甚至白色, 在白性的植株中未能检测到花色苷的存在^[22]; 红、紫、蓝色花瓣的荷花 (*Nelumbo nucifera*) 中 *F3H* 基因的表达量较高, 且花瓣由白色变为粉色时 *F3H* 表达量增加^[23]; 在 4 种花色滇水金凤 (*Impatiens uliginosa*) 的 4 个不同花器官发育时期, *IuF3H* 基因的表达量不同, 其中深红色的始花期表达量最高, 粉红色的盛花期表达量最低^[24]。这些研究结果表明了 *F3H* 的表达量与花青素含量的积累密切相关。

2.3 调节果实颜色

F3H 在植物成熟期的高表达, 将增加花青素的积累, 从而影响果实颜色。在梨 (*Pyrus communis* L.) 的果色突变体中, 随着果皮颜色变化 *F3H* 的表达水平不同^[25]; 李明等^[26] 分析了 *F3H* 基因在花生 (*Arachis hypogaea* L.) 紫色种质材料及栽培品种丰花

1号中的表达情况,结果表明花生紫色种质材料中*AhF3H*的相对表达水平明显高于丰花1号,同花青素含量呈正相关;在红穗醋栗(*Ribes rubrum* L.)果实着色过程中,*F3H*的表达量随着果实颜色加深而上升,在着色约75%时表达量达到最高值;在白穗醋栗(*R. albrum* L.)中*F3H*表达逐渐下降,且*F3H*在红穗醋栗中的表达量高于白穗醋栗^[27];通过RT-PCR分析3种不同着色的芒果(*Mangifera indica*),发现在红色的贵妃芒果品种果皮中*F3H*的表达量最高,其次是黄色的金煌品种,最低的是绿色的桂七品种^[28];利用3种Cas9变体,敲除胡萝卜(*Daucus carota* L.)紫色愈伤组织中的*F3H*基因,阻断紫色愈伤组织中花青素的生物合成,导致愈伤组织变为白色^[29];与石夏龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.)相比,红果皮龙眼中*F3H*等基因显著上调,使果皮中积累了花青素,呈现强烈红色^[30];在草莓(*Fragaria × ananassa* Duch.)果实成熟过程中*FaF3H*基因在白果时期的转录水平较低,全红时期表达量最高;反义抑制*F3H*的表达则会阻断花青素合成代谢,影响果实中花青素积累^[31-32]。综上所述,*F3H*是否表达以及表达强度是果实花青素合成的关键。

3 *F3H* 参与黄酮醇类合成的研究

3.1 合成路径

黄酮醇的生物合成是柚皮素在黄烷酮3-羟化酶(*F3H*)、类黄酮3'-羟化酶(*F3'H*)或类黄酮3',5'-羟化酶(*F3'5'H*)催化下产生不同的二氢黄酮醇。此外,二氢黄酮醇可以在黄酮醇合酶(flavonol synthase, *FLS*)催化下脱氢去饱和形成黄酮醇苷元,在糖基转移酶(UDP-glycosyltransferase, *UGT*)催化下发生糖基化等修饰,形成结构多样的黄酮醇衍生物^[33]。

3.2 对黄酮类物质含量的影响

*F3H*作用于类黄酮途径的分叉点,导致产生不同的类黄酮,如黄酮、黄酮醇、花青素和原花青素^[34]。*F3H*的表达量高,可使植物组织中黄酮类物质含量的升高。研究发现,利用反义技术沉默苹果*MdF3H*基因,与野生型相比,黄烷酮的含量增加,但其下游产物的含量降低,表明*F3H*基因突变抑制了黄烷酮类物质向下游代谢物的转化^[35]。将

番茄(*Solanum lycopersicum*)*SlF3H*基因转入烟草(*Nicotiana tabacum*),结果表明超表达*SlF3H*基因的烟草中类黄酮的含量提高,高出野生型约30%^[36]。在青蒿(*Artemisia annua* L.)中,*AaF3H*基因在黄酮类化合物含量较高的品种中表达量较高,在黄酮类含量较低的品种中表达量较低^[37]。此外,Song等^[38]发现超表达枸杞(*Lycium chinense*)*LcF3H*的烟草中黄烷-3-醇(儿茶素、表儿茶素)的含量增加。将茶树*CsF3Hs*基因转入拟南芥,发现在种子中大多数黄酮醇苷和低聚原花青素的含量显著增加,表明*CsF3Hs*在茶树类黄酮生物合成中起着关键作用^[39]。在烟草中导入藤茶(*Ampelopsis grossedentata*)*AgF3H*基因过表达载体,与野生型相比,转基因烟草叶片中的总黄酮含量提高,最高提高了26.8%^[40]。Jan等^[41]研究表明*OsF3H*基因在水稻(*Oryza sativa* L.)中的过度表达可以显著增加黄酮类化合物的生物合成。综上,*F3H*基因的表达受到抑制或过表达,会直接导致类黄酮代谢合成下调或上调。

4 *F3H* 的调控网络

4.1 同其他结构基因共同调控黄酮类化合物表达

FLS、*ANS*和*F3H*都属于2-ODD类加氧酶家族,在黄酮类化合物的生物合成中都具有重要作用,共同调节植物组织中黄酮的积累模式,当烟草*NtFLS*基因被沉默时,儿茶素、原花青素等花青素含量提高,*NtANS*基因被沉默时,黄酮醇含量显著增加,当*NtF3H*基因抑制时,黄酮醇和花青素含量均降低^[42]。将四翅滨藜(*Atriplex canescens*)*AcF3H*基因转入拟南芥中,发现*AcF3H*超表达会影响其下游基因*DFR*和*ANS*,相比于野生型,*AtDFR*和*AtANS*的表达量分别增加了1.9倍和1.8倍,进一步促进黄酮类化合物的合成^[43]。

4.2 转录因子参与调控

多个转录因子参与调控*F3H*等结构基因。很重要的一类转录因子是MYB(v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog)。桃子(*Prunus persica* (L.) Batsch)中转录因子MYB10.1和MYB10.3正向促进了*F3H*基因的表达^[44]。Kee等^[45]将来自萝卜(*Raphanus sativus*)的转录因子*RsMYB1*转入菊花(*Chrysanthemum morifolium*)中,发现*RsMYB1*

能够提高 *F3H* 的表达水平,且转基因品系中的花青素含量显著高于对照组。牡丹 (*Paeonia suffruticosa* Andrews) 的 MYB 类转录因子 *PsMYB58* 过表达烟草,发现在不同器官中花青素含量积累增加,花青素合成基因相关结构基因 *F3H* 表达也增强^[46]。而 MYB 抑制因子可直接通过调控结构基因抑制花青素的合成, *AtMYBL2* 通过调控 *F3H* 等表达,进而抑制幼苗期花青素^[47]。通过大豆发根系统,过表达大豆中 bHLH (basic Helix-Loop-Helix, bHLH) 转录因子 *GmbHLH3* 株系中, *GmF3H* 基因的转录水平升高,转拟南芥发现能提高黄酮类物质积累^[48]。另外,也有其他类转录因子参与调控的研究,拟南芥根系中的类黄酮生物合成受 GRAS (generally recognized as safe) 家族转录因子 SCL3 (SCARECROW-LIKE 3) 的调控,在 SCL3 表达高于正常水平时, *F3H* 显著增加^[49]。 *F3H/TT6* 在 *AtZAT6* 过表达植物中表现出较高水平^[50]。在 SRS5 (SHI-RELATED sequence 5) 过表达植物中, *F3H* 等黄酮/花青素生物合成相关基因表达下调^[51]。

4.3 外界诱导

环境因素也能影响 *F3H* 基因的表达,全日照白光的光强下,银杏 (*Ginkgo biloba* L.) 幼苗叶片中黄酮醇的含量和 *F3H* 表达也最高^[52]。UV-B 辐射诱导山茶 *CsF3Hs* 活性增加,从而增加山茶中黄酮类化合物的积累^[53]。以上结果表明,高等植物 UV 胁迫能够诱导 *F3H* 等结果基因的表达,从而提高黄酮类物质含量。郑晟等^[54]对柠条锦鸡儿 (*Caragana korshinskii*) 分别进行低温、高盐以及干旱胁迫处理, *CtF3H* 基因的表达量先升高后降低,且均高于对照水平。在茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 的外部刺激下, *CtF3H* 在醌查尔酮型红花株 (花橙黄色) 和黄酮型红花株 (花白色) 的转录组表达呈现截然相反的表达模式^[55]。在红米稻的叶面喷洒 FeSO_4 , *F3H* 的表达上调,水稻中的原花青素含量显著增加^[56]。HY5 (long hypocotyl 5) 可以直接结合许多与花青素生物合成有关的基因的启动子,包括 *CHS* 和 *F3H*^[57]。在 20℃/光照条件下处理的李子 (*Prunus salicina* Lindl.) 果皮, *F3H* 基因上调表达,在 30℃/黑暗条件下, *F3H* 表达受到抑制^[58]。以上

研究表明,外界环境及其他因素的改变,如光照、温度等,可以提高 *F3H* 的表达量,促进黄酮类化合物的生成。

5 展望

F3H 基因作为花青素合成途径和黄酮醇合成途径中的关键酶,在许多植物中都已克隆得到。近年来主要研究集中于 *F3H* 基因在花色育种、果色形成中的调控作用,以及非生物胁迫对花色素苷合成的影响^[59]。另外在花香基因工程中也有应用研究,通过反义抑制黄烷酮-3-羟化酶基因阻碍康乃馨花青素的合成,将代谢转移到苯甲酸途径,从而苯甲酸甲酯含量提高,使转基因植株花朵香味更浓^[22]。目前对植物黄酮类具体化合物含量的研究相对较少,随着转基因、基因编辑技术及代谢物测定技术发展迅速,今后对重要经济植物的 *F3H* 基因进行克隆,并借助基因工程手段进一步了解其调节功能,有助于深入研究如何提高植物黄酮类化合物含量;植物次生代谢合成过程极其复杂,需要各种酶的协同作用,因此研究 *F3H* 基因与其他结构基因和转录因子的协同转化,能更好地调控转化植株目的次生代谢产物的含量^[60],培育植物新种质。另外包括代谢组学在内的多组学联合研究也将是今后研究 *F3H* 参与次生代谢基因工程研究的重要生物信息学手段和方向。

参考文献

- [1] Schijlen EG, Ric de Vos CH, van Tunen AJ, et al. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65 (19): 2631-2648.
- [2] Wasson AP, Pellerone FI, Mathesius U. Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia [J]. *Plant Cell*, 2006, 18 (7): 1617-1629.
- [3] Chen ZW, Hu YZ, Wu HH, et al. Synthesis and biological evaluation of flavonoids as vasorelaxant agents [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004, 14 (15): 3949-3952.
- [4] Davuluri GR, van Tuinen A, Fraser PD, et al. Fruit-specific RNAi-mediated suppression of *DET1* enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23 (7): 890-895.
- [5] Martin C, Prescott A, Mackay S, et al. Control of anthocyanin

- biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus* [J]. Plant J, 1991, 1 (1): 37-49.
- [6] Britsch L, Ruhnau-Brich B, Forkmann G. Molecular cloning, sequence analysis, and *in vitro* expression of flavanone 3 beta-hydroxylase from *Petunia hybrida* [J]. J Biol Chem, 1992, 267 (8): 5380-5387.
- [7] Davies KM. A cDNA clone for flavanone 3-hydroxylase from *Malus* [J]. Plant Physiol, 1993, 103 (1): 291.
- [8] Sparvoli F, Martin C, Scienza A, et al. Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.) [J]. Plant Mol Biol, 1994, 24 (5): 743-755.
- [9] Deboo GB, Albertsen MC, Taylor LP. Flavanone 3-hydroxylase transcripts and flavonol accumulation are temporally coordinate in maize anthers [J]. Plant J, 1995, 7 (5): 703-713.
- [10] Pelletier MK, Shirley BW. Analysis of flavanone 3-hydroxylase in *Arabidopsis* seedlings Coordinate regulation with *Chalcone synthase*. and *Chalcone isomerase* [J]. Plant Physiol, 1996, 111 (1): 339-345.
- [11] Zabala G, Vodkin LO. The wp mutation of *Glycine max* carries a gene-fragment-rich transposon of the CACTA superfamily [J]. Plant Cell, 2005, 17 (10): 2619-2632.
- [12] Tu YH, Liu F, Guo DD, et al. Molecular characterization of flavanone 3-hydroxylase gene and flavonoid accumulation in two chemotyped safflower lines in response to methyl jasmonate stimulation [J]. BMC Plant Biol, 2016, 16 (1): 132.
- [13] 张星, 杨捷, 彭梦笛, 等. 百合黄烷酮-3-羟化酶基因 LhSorF3H 的克隆与表达 [J]. 西北植物学报, 2017, 37 (12): 2325-2331.
- Zhang X, Yang J, Peng MD, et al. Cloning and expression of LhSorF3H genes in *Lilium* [J]. Acta Bot Boreali Occidentalia Sin, 2017, 37 (12): 2325-2331.
- [14] Gong ZZ, Yamazaki M, Sugiyama M, et al. Cloning and molecular analysis of structural genes involved in anthocyanin biosynthesis and expressed in a forma-specific manner in *Perilla frutescens* [J]. Plant Mol Biol, 1997, 35 (6): 915-927.
- [15] Owens DK, McIntosh CA. Biosynthesis and function of citrus glycosylated flavonoids [M] //Gang DR. The Biological activity of phytochemicals. New York, NY: Springer, 2011: 37-95.
- [16] Liu ML, Li XR, Liu YB, et al. Regulation of flavanone 3-hydroxylase gene involved in the flavonoid biosynthesis pathway in response to UV-B radiation and drought stress in the desert plant, *Reaumuria soongorica* [J]. Plant Physiol Biochem, 2013, 73: 161-167.
- [17] 黄元射, 舒田, 毛景欣, 等. 紫色甘薯渝紫薯 7 号黄烷酮-3-羟化酶基因的克隆和序列分析 [J]. 西南农业学报, 2016, 29 (3): 486-490.
- Huang YS, Shu T, Mao JX, et al. Molecular cloning and sequences analysis of flavanone 3-hydroxy lase gene from YuZi7 [J]. Southwest China J Agric Sci, 2016, 29 (3): 486-490.
- [18] 范晶, 黄明远, 吴苗苗, 等. 山茶属三个 *F3H* 基因的分子特性、系统进化及蛋白结构差异分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35 (5): 1195-1205.
- Fan J, Huang MY, Wu MM, et al. Comparison of molecular characteristics, phylogeny and structure of three *Camellia F3H* genes [J]. Genom Appl Biol, 2016, 35 (5): 1195-1205.
- [19] 王鸿雪, 刘天宇, 庄维兵, 等. 花青素苷在植物逆境响应中的功能研究进展 [J]. 农业生物技术学报, 2020, 28 (1): 174-183.
- Wang HX, Liu TY, Zhuang WB, et al. Research advances in the function of anthocyanin in plant stress response [J]. J Agric Biotechnol, 2020, 28 (1): 174-183.
- [20] Holton TA, Cornish EC. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis [J]. Plant Cell, 1995, 7 (7): 1071-1083.
- [21] Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids [J]. Plant J, 2008, 54 (4): 733-749.
- [22] Zuker A, Tzfira T, Ben-Meir H, et al. Modification of flower color and fragrance by antisense suppression of the flavanone 3-hydroxylase gene [J]. Mol Breed, 2002, 9 (1): 33-41.
- [23] Chaipanya C, Saetiew K, Arunyanart S, et al. Isolation and expression analysis of the flavanone-3-hydroxylase genes in Lotus (*Nelumbo nucifera* gaertn.), Waterlily (*Nymphaea* sp.) and transient silencing in Waterlily [J]. Chiang Mai J Sci, 2017; 44 (2): 427-437.
- [24] 冯志熙, 刘应丽, 朱佳鹏, 等. 滇水金凤黄烷酮-3-羟化酶基因 (*IuF3H*) 的克隆及表达分析 [J]. 分子植物育种, 2021, 19 (1): 65-71.
- Feng ZX, Liu YL, Zhu JP, et al. Cloning and expression analysis of *IuF3H* gens in *Impatiens uliginosa* [J]. Mol Plant Breed, 2021, 19 (1): 65-71.

- [25] Yang YN, Zhao G, Yue WQ, et al. Molecular cloning and gene expression differences of the anthocyanin biosynthesis-related genes in the red/green skin color mutant of pear (*Pyrus communis* L.) [J]. *Tree Genet Genomes*, 2013, 9 (5): 1351-1360.
- [26] 李明, 王玉红, 李长生, 等. 花生黄酮 3-羟化酶基因 *AhF3H* 的克隆和表达分析 [J]. *山东农业科学*, 2013, 45 (11): 1-6.
Li M, Wang YH, Li CS, et al. Cloning and expression analysis of flavanone 3-hydroxylase gene, *AhF3H*, from *Arachis hypogaea* L. [J]. *Shandong Agric Sci*, 2013, 45 (11): 1-6.
- [27] 王海竹, 闫海芳, 徐启江. 红穗和白穗醋栗 *F3H* 的克隆及其在果实成熟过程中的表达分析 [J]. *园艺学报*, 2016, 43 (10): 2003-2011.
Wang HZ, Yan HF, Xu QJ. Molecular cloning and expression analysis of *F3H* gene in *Ribes rubrum* and *R. albrum* during fruit mature [J]. *Acta Hort Sin*, 2016, 43 (10): 2003-2011.
- [28] 刘宽亮, 赵志常, 高爱平, 等. 芒果 (*Mangifera indica*) 黄酮 3-羟化酶基因的克隆及其表达分析 [J]. *分子植物育种*, 2017, 15 (6): 2106-2111.
Liu KL, Zhao ZC, Gao AP, et al. Cloning and expression analysis of *F3H* gene from mango (*Mangifera indica*) [J]. *Mol Plant Breed*, 2017, 15 (6): 2106-2111.
- [29] Klimek-Chodacka M, Oleszkiewicz T, Lowder LG, et al. Efficient CRISPR/Cas9-based genome editing in carrot cells [J]. *Plant Cell Rep*, 2018, 37 (4): 575-586.
- [30] Yi DB, Zhang HN, Lai B, et al. Integrative analysis of the coloring mechanism of red longan pericarp through metabolome and transcriptome analyses [J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69 (6): 1806-1815.
- [31] Jiang F, Wang JY, Jia HF, et al. RNAi-mediated silencing of the flavanone 3-hydroxylase gene and its effect on flavonoid biosynthesis in strawberry fruit [J]. *J Plant Growth Regul*, 2013, 32 (1): 182-190.
- [32] 尹潇雪, 蔡雯婷, 刘晓言, 等. ‘红颜’草莓果实黄酮 3-羟化酶基因克隆及表达分析 [J/OL]. *分子植物育种*. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210525.0952.005.html>.
Yin XX, Cai WT, Liu XY, et al. Cloning and expression analysis of flavanone 3-hydroxylase gene in fruit of ‘Benihoppe’ strawberry [J/OL]. *Molecular Plant Breeding*. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210525.0952.005.html>.
- [33] Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology [J]. *Plant Physiol*, 2001, 126 (2): 485-493.
- [34] Mahajan M, Yadav SK. Overexpression of a tea flavanone 3-hydroxylase gene confers tolerance to salt stress and *Alternaria solani* in transgenic tobacco [J]. *Plant Mol Biol*, 2014, 85 (6): 551-573.
- [35] Flachowsky H, Halbwirth H, Treutter D, et al. Silencing of flavanone-3-hydroxylase in apple (*Malus × domestica* Borkh.) leads to accumulation of flavanones, but not to reduced fire blight susceptibility [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2012, 51: 18-25.
- [36] Meng C, Zhang S, Deng YS, et al. Overexpression of a tomato flavanone 3-hydroxylase-like protein gene improves chilling tolerance in tobacco [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2015, 96: 388-400.
- [37] Xiong S, Tian N, Long JH, et al. Molecular cloning and characterization of a flavanone 3-Hydroxylase gene from *Artemisia annua* L. [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2016, 105: 29-36.
- [38] Song XY, Diao JJ, Ji J, et al. Molecular cloning and identification of a flavanone 3-hydroxylase gene from *Lycium chinense*, and its overexpression enhances drought stress in tobacco [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2016, 98: 89-100.
- [39] Han YH, Huang KY, Liu YJ, et al. Functional analysis of two flavanone-3-hydroxylase genes from *Camellia sinensis*: a critical role in flavonoid accumulation [J]. *Genes*, 2017, 8 (11): 300.
- [40] 许明, 伊恒杰, 郭佳鑫, 等. 藤茶黄酮 3-羟化酶基因 *AgF3H* 的克隆及表达分析 [J]. *西北植物学报*, 2020, 40 (2): 185-192.
Xu M, Yi HJ, Guojia X, et al. Cloning and expression analysis of a flavanone 3-hydroxylase gene from *Ampelopsis grossedentata* [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2020, 40 (2): 185-192.
- [41] Jan R, Asaf S, Paudel S, et al. Discovery and validation of a novel step catalyzed by OsF3H in the flavonoid biosynthesis pathway [J]. *Biology*, 2021, 10 (1): 32.
- [42] Wang Z, Wang SS, Wu MZ, et al. Evolutionary and functional analyses of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase genes involved in the flavonoid biosynthesis pathway in tobacco [J]. *Planta*, 2019, 249 (2): 543-561.
- [43] 王贝贝. 四翅滨藜类黄酮合成关键酶编码基因的克隆及功能分析 [D]. 兰州: 兰州大学, 2021.

- Wang BB. Cloning and functional analysis of genes encoding key enzymes of flavonoid synthesis from *Atriplex canescens* [D]. Lanzhou : Lanzhou University, 2021.
- [44] Rahim MA, Busatto N, Trainotti L. Regulation of anthocyanin biosynthesis in peach fruits [J]. *Planta*, 2014, 240 (5): 913-929.
- [45] Kee ES, Naing AH, Lim SH, et al. MYB transcription factor isolated from *Raphanus sativus* enhances anthocyanin accumulation in *Chrysanthemum* cultivars [J]. *3 Biotech*, 2016, 6 (1): 79.
- [46] Zhang YZ, Xu SZ, Ma HP, et al. The R2R3-MYB gene *PsMYB58* positively regulates anthocyanin biosynthesis in tree peony flowers [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2021, 164: 279-288.
- [47] Zhu HF, Fitzsimmons K, Khandelwal A, et al. CPC, a single-repeat R3 MYB, is a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *Mol Plant*, 2009, 2 (4): 790-802.
- [48] Wang TL, Wang S, Wang Y, et al. Jasmonic acid-induced inhibition of root growth and leaf senescence is reduced by GmbHLH3, a soybean bHLH transcription factor [J]. *Can J Plant Sci*, 2020, 100 (5): 477-487.
- [49] Weng CY, Zhu MH, Liu ZQ, et al. Integrated bioinformatics analyses identified SCL3-induced regulatory network in *Arabidopsis thaliana* roots [J]. *Biotechnol Lett*, 2020, 42 (6): 1019-1033.
- [50] Shi HT, Liu GY, Wei YX, et al. The zinc-finger transcription factor ZAT6 is essential for hydrogen peroxide induction of anthocyanin synthesis in *Arabidopsis* [J]. *Plant Mol Biol*, 2018, 97 (1/2): 165-176.
- [51] Yuan TT, Xu HH, Zhang Q, et al. The COP₁ target SHI-RELATED SEQUENCE5 directly activates photomorphogenesis-promoting genes [J]. *Plant Cell*, 2018, 30 (10): 2368-2382.
- [52] Xu Y, Wang GB, Cao FL, et al. Light intensity affects the growth and flavonol biosynthesis of *Ginkgo* (*Ginkgo biloba* L.) [J]. *New For*, 2014, 45 (6): 765-776.
- [53] Han YH, Huang KY, Liu YJ, et al. Functional analysis of two flavanone-3-hydroxylase genes from *Camellia sinensis*: a critical role in flavonoid accumulation [J]. *Genes*, 2017, 8 (11): 300.
- [54] 郑晟, 毛玉珊, 张腾国, 等. 柠条锦鸡儿 *F3H* 基因克隆及功能分析 [J]. *广西植物*, 2017, 37 (6): 723-733.
- Zheng S, Mao YS, Zhang TG, et al. Cloning and expression analysis of *F3H* gene in *Caragana korshinskii* [J]. *Guihaia*, 2017, 37 (6): 723-733.
- [55] 何贝轩, 薛英茹, 涂燕华, 等. CtCHS4 响应茉莉酸甲酯诱导促进了红花醌式查尔酮类化合物的积累 [J]. *药学报*, 2018, 53 (4): 636-645.
- He BX, Xue YR, Tu YH, et al. Ct CHS₄ induces the accumulation of safflower quinone chalcones in response to methyl jasmonate induction [J]. *Acta Pharm Sin*, 2018, 53 (4): 636-645.
- [56] He Y, Luo Y, Wang Q, et al. Spray treatment of leaves with Fe²⁺ promotes procyanidin biosynthesis by upregulating the expression of the F3H and ANS genes in red rice grains (*Oryza sativa* L.) [J]. *J Cereal Sci*, 2021, 100: 103231.
- [57] Lee J, He K, Stole V, et al. Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development [J]. *Plant Cell*, 2007, 19 (3): 731-749.
- [58] Fang ZZ, Kui LW, Jiang CC, et al. Postharvest temperature and light treatments induce anthocyanin accumulation in peel of 'Akihime' plum (*Prunus salicina* Lindl.) via transcription factor PsMYB10.1 [J]. *Postharvest Biol Technol*, 2021, 179: 111592.
- [59] 张学英, 张上隆, 骆军, 等. 果实花色素苷合成研究进展 [J]. *果树学报*, 2004, 21 (5): 456-460.
- Zhang XY, Zhang SL, Luo J, et al. Advances in research on fruit anthocyanin synthesis [J]. *J Fruit Sci*, 2004, 21 (5): 456-460.
- [60] 沈忠伟, 许昱, 夏彝, 等. 植物类黄酮次生代谢生物合成相关转录因子及其在基因工程中的应用 [J]. *分子植物育种*, 2008, 6 (3): 542-548.
- Shen ZW, Xu Y, Xia B, et al. Transcription factors involved in plant flavonoid biosynthesis of secondary metabolism and its application in genetic engineering [J]. *Mol Plant Breed*, 2008, 6 (3): 542-548.

(责任编辑 张婷婷)