

植物中 α -酮戊二酸/Fe(II)依赖双加氧酶研究进展

王熙昂, 王彪, 李海燕, 邢巧娟, 赵鹏斌, 顾馨怡, 李宏博*

沈阳农业大学园艺学院, 沈阳110866

*通信作者(lhb@syau.edu.cn)

摘要: α -酮戊二酸(2OG)/Fe(II)依赖双加氧酶[2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenases, 2-ODD]广泛参与植物的多种代谢过程, 是植物体内一种重要的氧化酶。它不仅对植物的生长发育具有重要意义, 而且在许多药用植物活性成分的生物合成中扮演重要的角色。本文主要综述2-ODD参与的不同代谢反应, 为深入研究2-ODD功能提供参考。

关键词: α -酮戊二酸/Fe(II)依赖双加氧酶; 氧化酶; 羟基化; 去甲基化; 生物合成

Research progress of 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenases in plant

WANG Xi'ang, WANG Biao, LI Haiyan, XING Qiaojuan, ZHAO Pengbin, GU Xinyi, LI Hongbo*

College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China

*Corresponding author (lhb@syau.edu.cn)

Abstract: 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenases is a critical kind of oxygenase in plant, which are widely involved in various metabolic pathway of plant. Not only can they regulate growth and development of almost all kinds of plants, but they also play an important role in the biosynthesis pathway of active ingredients of herbs. In this review, metabolic reactions catalyzed by 2-ODD were described. Consequently, this will provide references for future study of 2-ODD.

Key words: 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenases; oxygenase; hydroxylation; demethylation; biosynthesis

α -酮戊二酸/Fe(II)依赖双加氧酶[2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenases, 2-ODDs, 也作2-OGDs、2-OGXs], 是一类不含血红素的单核铁原子蛋白(也存在一小部分以其他金属原子作为辅基), 广泛分布于自然界, 在动物、植物和微生物中都有报道(De Carolis和De Luca 1994)。第一个被鉴定的2-ODD是胶原蛋白生物合成通路中的一个关键酶——脯氨酸羟化酶, 这为2-ODD的研究奠定了基础(Hutton等1967)。之后, 相继有研究报道了其在动植物生长发育调控、转录调控、核苷酸的修饰或核酸修复、脂肪酸的代谢以及一些具有药用价值的次生代谢物的生物合成中的重要作用(Islam等2018)。

2-ODD和细胞色素P450加氧酶(cytochrome P450, CYPs)是自然界中催化反应种类最丰富的2种加氧酶, 但2-ODD仅仅使用2个或者3个配体来螯合Fe(II), 因此, 与CYP450 (亚铁离子由4个卟啉螯合)相比, 2-ODD具有更高的灵活性, 其所催化的反应更具多样性和复杂性(Farrow和Facchini 2014)。2-ODD功能的多样性和其结构密切相关, 其功能域包含一个扭曲的双股 β 螺旋(double-stranded β -he-

收稿 2021-06-11 修定 2021-08-11

资助 2018年全国中药资源普查项目(1102-01042918001)和中央本级重大增减支项目(2060302)。

lix, DSBH)核心折叠结构域(Roach等1995), 包括8条 β 折叠股, 每2条连续的 β 折叠股之间以反向平行的方式排列, 最终4对 β 折叠股形成一个扁桶状的DSBH结构(Clifton等2006)。其反应过程包括2-ODD催化底物氧化反应和共底物 α -酮戊二酸(2-oxoglutarate, 2OG)氧化脱羧反应, 最终, 2OG转化为琥珀酸(盐)并释放 CO_2 , 而底物则转化为相应的氧化产物(Farrow和Facchini 2014; Wilmouth等2002; Flashman和Schofield 2007; Hangasky等2013)。

2-ODD是一个庞大的基因家族, 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)基因组中包含超过130条2-ODD基因, 大约占整个基因组的0.5%, 根据其氨基酸序列BLAST P值被分为3个具有明显差异的亚家族DOXA、DOXB和DOXC (Kawai等2014)。其中DOXA亚家族参与初生代谢, 包括大肠杆菌(*Escherichia coli*) Alkb的植物同源蛋白。Alkb被认为是植物2-ODD的原始形态, 其功能是断裂C-N键, 将核苷酸的N-甲基基团进行氧化去甲基化, 从而通过表观修饰来调节生命活动(Falnes等2002; Kawai等2014)。DOXB亚家族基因编码脯氨酰4-羟化酶(prolyl 4-hydroxylases, P4Hs), 主要参与多肽链翻译后的修饰, 对植物细胞壁和信号肽类激素的形成具有重要作用。由于DOXA和DOXB调控植物关键的生长发育过程, 因而在数量和蛋白序列上具有较高的保守性。DOXC亚家族参与植物的次生代谢, 包括酚酸类、生物碱类以及萜类成分等, 它在不同植物体内数量和功能差异较大, 具有较大的物种间特异性, 绝大多数参与植物次生代谢的2-ODD都属于这一亚家族(Kawai等2014)。这三类2-ODD在植物界中广泛存在, 可以催化羟基化反应、去甲基化反应、开环反应、去饱和反应、闭(成)环反应和卤化反应等(Islam等2018)。

关于2-ODD催化反应的分子机制研究中, 羟基化反应具有较为详细地阐明。首先, HX (D/E) XnH的3个保守氨基酸残基和Fe(II)发生互作, 另外三个互作位点被水分子占据。之后, 2OG的C1和羰基氧原子取代两分子水和Fe(II)发生作用。由于底物和2-ODD活性中心结合, 从而取代了另一个水分子, 并为 O_2 与Fe(II)结合创造条件。接着, Fe(II)、 O_2 和2OG发生互作, 形成高价Fe(IV)-羰基中间体,

并从底物上夺取氢原子, 形成Fe(III)-OH和底物自由基, 最后羟基和底物结合形成羟基化产物(Krebs等2007; Martinez和Hausinger 2015)。卤化反应和羟基化反应的分子机制在 O_2 和Fe(II)发生作用之前几乎是相同的, 除了卤素离子代替D/E残基和Fe(II)互作。之后形成卤素-Fe(IV)-羰基中间体并从底物上夺取氢原子, 最后底物自由基和卤素离子发生互作形成卤化物。有研究表明, 2-ODD催化卤化反应和底物的结构有密切关系, 改变底物结构能够生成羟基化产物(Matthews等2009; Martinez和Hausinger 2015)。2-ODD催化其它种类的反应机制虽有一定的研究, 但均未完全阐明。

本文基于前人的研究, 主要对植物2-ODD基因家族参与的多种代谢途径进行综述, 对于未来进一步明确2-ODD基因家族的空间结构, 扩大参与代谢过程的范围, 调控药用植物的有效成分的生物合成具有重要意义。

1 2-ODD参与翻译后修饰

DOXB亚家族中的P4Hs在植物体内具有重要作用。P4H将肽链中的脯氨酸残基羟基化, 从而进行翻译后修饰(Gorres和Raines 2010)。其产物羟脯氨酸是构成植物以及哺乳动物体内多种结构蛋白的主要氨基酸, 比如胶原蛋白以及组成植物细胞壁的糖蛋白, 后者对植物的生长发育具有重要意义(Soares等2011)。在动物体内, 一类P4H作为氧气含量感受器, 参与调控缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)的活性(Farrow和Facchini 2014), 近期, Konkina等(2021)发现拟南芥

p4h3

突变体对低含氧量的敏感性提高, 且在缺氧处理后阿拉伯半乳糖蛋白含量下降, 乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase)和蔗糖合成酶(sucrose synthase)编码基因表达量下调, 可能由于无氧呼吸过程受到了影响, 作用机制还需要进一步探索。也有研究表明P4H在植物体内可能参与缺铁反应的调控(Vigani等2013)。

2 2-ODD参与碱基去甲基化

在植物中参与碱基去甲基化的2-ODD属于DOXA亚家族, 是一类AlkbH蛋白, 由大肠杆菌中的DNA修复蛋白Alkb进化而来(Kawai等2014)。真核

生物中AlkbH所具有的功能和Alkb相比, 还包括对RNA的修饰以及对其他生理过程的调控(Marcinkowski等2020)。在人体中, 目前已知的AlkbH类蛋白包括修复DNA和修饰RNA的功能, 而在植物中的AlkbH主要参加单链RNA中N-甲基腺嘌呤的去甲基化。AlkbH9B通过对苜蓿花叶病毒(*Alfalfa mosaic virus*) RNA中碱基的去甲基化来调控病毒RNA在植物细胞内的复制, 从而参与植物的抗病过程(Martínez-Pérez等2017)。Duan等(2017)通过对体外和体内功能的研究鉴定了另一个具有mRNA N-甲基腺嘌呤去甲基化功能的AlkbH家族成员——*AlkbH10B*, 它可以通过去甲基化影响调控植物生长以及开花的基因的mRNA的稳定性, 从而调控相关生理过程, *AlkbH10B*突变体具有生长缓慢、开花晚的特点。番茄(*Solanum lycopersicum*)中的*SlAlkbH2*能够降低*SIDML2* (*DNA demethylase*) mRNA的甲基化程度, 从而调控果实成熟。同时, *SlAlkbH2*基因的表达水平也受DNA甲基化的调控(Zhou等2019)。Huong等(2020)发现拟南芥*alkbh6*突变体在受到盐胁迫、干旱胁迫和温度胁迫的情况下生存能力显著降低, 证明RNA的去甲基化介导植物抵抗非生物胁迫。

3 2-ODD参与组蛋白的去甲基化

组蛋白的甲基化和去甲基化是一类重要的表观修饰过程, 可调控多种植物生理活动, 包括光周期诱导植物开花的过程以及植物生物钟等(刘士霞2018)。目前已鉴定的2-ODD具有精氨酸/赖氨酸去甲基化酶活性, 是一类JMJ蛋白, 分布于KDM5/JARID1、KDM3/JHDM2和Jmjc domain-only三个JMJ蛋白亚家族中。近期报道的JMJ16和JMJ17属于KDM5/JARID1亚家族, 具有组蛋白H3亚基4-甲基化赖氨酸的去甲基化酶活性(H3K4 demethylase), 前者调控由年龄决定的叶片衰老过程, 而后者参与缺水胁迫的应答(Liu等2019; Huang等2019)。而番茄中鉴定的SIJM6具有H3K27去甲基化酶活性(H3K27 demethylase), 能够激活*SIDML2*等调控果实成熟相关基因的表达, 过表达突变体的果实成熟速度加快(Li等2020a)。JMJ14 (Lu等2010)、JMJ15 (Shen等2014)和JMJ18 (Yang等2012)分别调控拟南

芥的开花和对盐胁迫的抵抗。另一个2-ODD——JMJ27属于KDM3/JHDM2亚家族, 具有组蛋白H3亚基9-甲基化赖氨酸的去甲基化酶活性(H3K9 demethylase), 参与防御病原菌的过程(Dutta等2017)。而Jmjc domain-only亚家族的JMJ20和JMJ22具有精氨酸去甲基化酶的活性, 通过提高种子内活性赤霉素的含量来诱导种子萌发(Cho等2012)。Lee等(2018)发现JMJ30能够提高拟南芥LBD16 (LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN)和LBD29基因的表达量, 从而诱导愈伤组织的形成。

4 2-ODD参与萜类代谢

4.1 2-ODD参与赤霉素的代谢

赤霉素(gibberellins, GAs)作为一类二萜化合物, 2-ODD通过对GA结构母核上的不同位点进行羟基化反应, 来调控GA的内源平衡。在众多衍生物中GA₁、GA₃、GA₄和GA₇的生物活性最高且均由GA₁₂衍生而来(高秀华和傅向东2018; Silverstone和Sun 2000; 黎家和李传友2019)。作为2-ODD在GA代谢中的典型代表, GA₂₀氧化酶、GA₃氧化酶和GA₂氧化酶在GAs生物合成和多样性组成中具有重要作用。其中, GA₃氧化酶(GA3-oxidases, GA3ox)催化GA₂₀和GA₉的C3位点的羟基化反应, 从而分别生成具有生物活性的GA₁和GA₄ (Chiang等1995; Lange等1997)。相反, GA₂氧化酶(GA2-oxidases, GA2ox)通过催化GA₁和GA₄的C2位点的羟基化反应, 分别生成GA₈和GA₃₄, 使GA活性降低(Martin等1999; Thomas等1999) (图1)。研究表明, 上述三种2-ODD还参与GAs其他环节的修饰。可见, 2-ODD对于调控植物体内GA的含量具有重要意义。

4.2 2-ODD参与独脚金内酯的代谢

2-ODD在独脚金内酯的生物合成中起重要作用。独脚金内酯(strigolactones, SLs)类成分是一类具有相似化学结构的植物激素, 可抑制植物的芽分支以及与微生物的互作。Brewer等(2016)鉴定了参与SLs代谢途径中的横向分支氧化还原酶(lateral branching oxidoreductase, LBO), 可催化SL的前体MeCLA (methyl carlactonoate)转化为一种未知的独脚金内酯类成分[MeCLA+16 D], 并且拟南芥的*lbo*突变体表现出比野生型更强的芽分支能力。

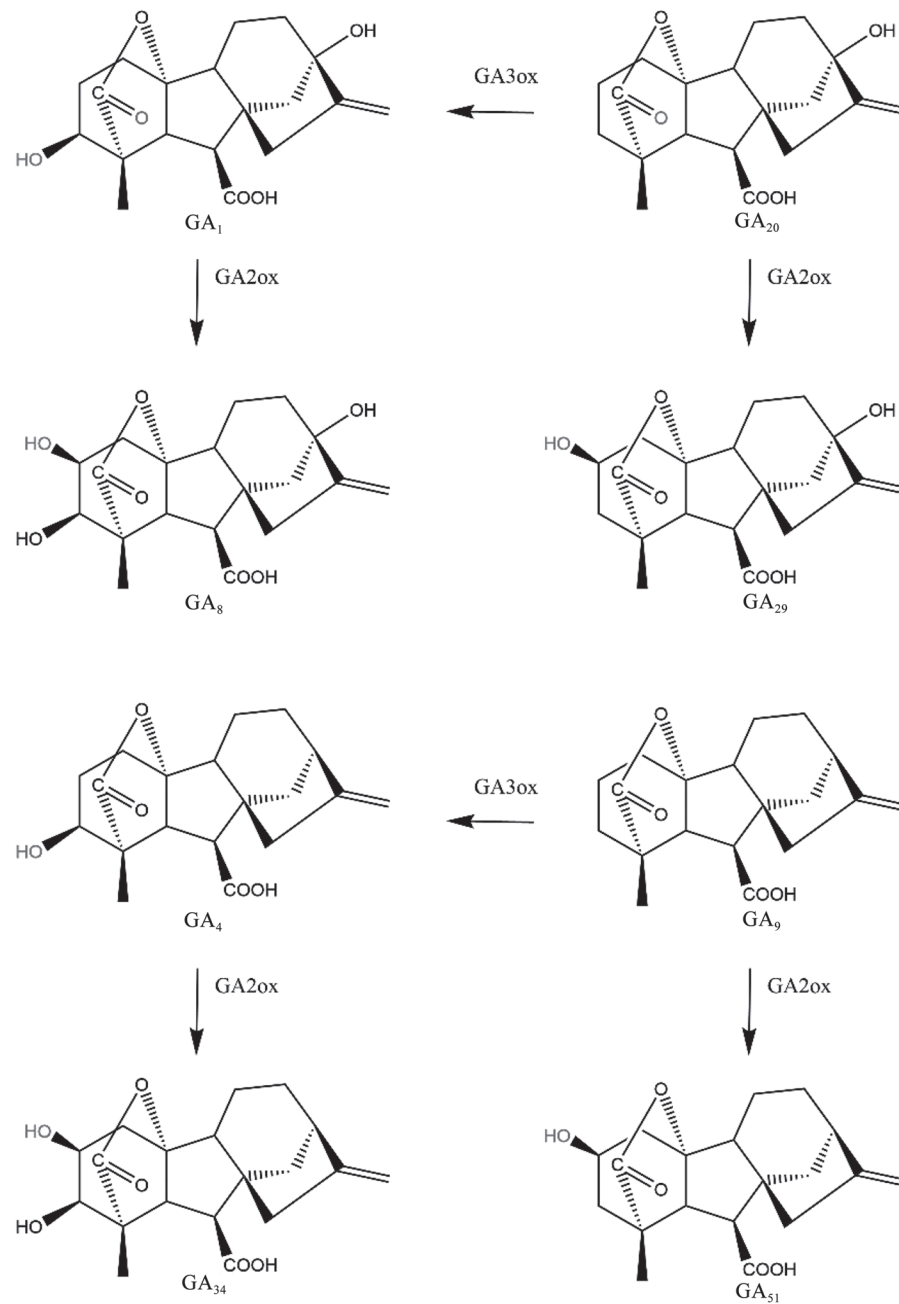


图1 GAs代谢过程

Fig. 1 Metabolic pathway of GAs

根据Farrow和Facchini (2014)一文改画。

而在光叶百脉根(*Lotus japonicus*)中, 另一个和LBO亲缘关系较近的2-ODD——LLD在一类非典型SL莲花内酯(lotuslactone)的生物合成中起重要作用(Mori等2020)。最近, Yoneyama等(2020)通过氘标

记的底物饲喂实验证明了[MeCLA+16 D]为1'-HO-MeCLA, 但他们在LBO的酶活实验中发现MeCLA的代谢产物不仅有1'-HO-MeCLA, 还有CLA。LBO的功能究竟是单一催化羟基化反应或去甲基化反

应还是同时催化2种反应, 还需要进一步明确。

除了上述两种植物激素代谢之外, Tian等(2018)在棉花(*Gossypium hirsutum*)发现2ODD-1能够在呋喃卡拉烯二酮(furocalamen-2-one) C3位点上进行羟基化, 从而参与倍半萜类次生代谢物棉酚(gossypol)的生物合成。

5 2-ODD参与酚酸类成分代谢

5.1 2-ODD参与水杨酸(salicylic acid)代谢

水杨酸是一类酚性植物激素, 参与多种植物生长发育过程的调控以及生物和非生物胁迫(Zhang等2013)。在水杨酸的代谢途径中, 2-ODD可使其活性下降, 通过调控植物体内活性水杨酸的含量来调控植物生长。植物体内的水杨酸只有小部分存在活性, 绝大部分的水杨酸通过糖基化、羟基化等途径被修饰, 从而协调其积累和转运(Lee等1995), 2-ODD参与了其羟基化修饰途径。拟南芥中主要存在2种羟基化产物2,3-二羟基苯甲酸(2,3-dihydroxybenzoic acid, 2,3-DHBA)和2,5-二羟基苯甲酸(2,5-dihydroxybenzoic acid, 2,5-DHBA)。Zhang等(2013)利用拟南芥叶片早衰突变体鉴定了一个2-ODD——水杨酸3-羟基化酶(salicylic acid 3-hydroxylase, S3H)参与水杨酸芳香环C3位点的羟基化。之后, Zhang等(2017)又用酶活筛选方法鉴定得到了水杨酸5-羟基化酶(salicylic acid 5-hydroxylase, S5H), 参与水杨酸芳香环C5位点的羟基化。水杨酸羟基化位点的差异使其糖基化产物更加多样化。Liu等(2020)在水稻(*Oryza sativa*)中发现SLC1 (SLENDER AND CRINKLY LEAF1)和SLC2属于2ODD家族, 参与水杨酸的生物合成。在过表达和 slc 突变体植株中, 水杨酸的含量发生明显变化, 但二者的具体功能尚未明确。

5.2 2-ODD参与黄酮类成分的生物合成

黄酮类化合物既可以保护植物免受UV-B的损伤(Li等1993), 还可以作为昆虫与植物之间的信号物质来吸引昆虫, 帮助传粉(Harborne和Williams 2000)。在黄酮代谢的核心通路中, 二氢黄酮是最关键的中间代谢物, 是黄酮、二氢黄酮醇和异黄酮等次生代谢物的直接前体。在二氢黄酮醇的生物合成中, 一个编码二氢黄酮3 β 羟基化酶(flavonone

3 β -hydroxylase, F3H)的2-ODD基因起关键作用(Britsch和Grisebach 1986; Britsch等1992)。F3H可将二氢黄酮转化为二氢黄酮醇。另外两个催化去饱和反应的2-ODD分别是黄酮合成酶(flavone synthase, FNSI) (Britsch 1990; Martens等2001)和黄酮醇合成酶(flavonol synthase, FLS) (Spribille和Forkmann 1984; Holton等1993), 能够催化C2/C3形成双键, 将二氢黄酮(醇)转化为黄酮(醇)。在被子植物门(*Angiospermae*)中, FNSI主要集中在伞形科(*Apiaceae*)植物中, 除此之外, 在拟南芥、水稻、玉米(*Zea mays*)、问荆(*Equisetum arvense*)和桑树(*Morus alba*)中也有发现, 而在其它科属的植物中被CYP450家族成员FNSII替代(Ferreira等2015; Lee等2008; Bredebach等2011; Li等2020b)。而在伞形科植物中, 目前发现了7个不同物种的FNSI, 包括欧芹(*Petroselinum crispum*)、旱芹(*Apium graveolens*)和欧白芷(*Angelica archangelica*)等(Martens等2001; Gebhardt等2005, 2007)。FNSI和FLS在一些植物中的作用比较特殊, 被鉴定为双功能酶。比如在钝鳞紫背苔(*Plagiochasma appendiculatum*)中鉴定的FNS I具有2-羟基化的活性可以将柚皮素转化为芹菜素和2-羟基柚皮素(Han等2014)。而在水稻中鉴定的一个FLS还具有F3H的功能, 将其在烟草中表达后, 花瓣中的花色素含量显著下降(Park等2019)。研究表明, FNS I在最原始的苔藓植物中出现, 逐步进化为FNS I/F2H或FNS I/F3H双功能酶, 最终在种子植物中形成专一的F3H。和苔藓植物中的FNSI相比, 伞形科植物中的FNSI和F3H具有更高的相似度, 这表明它是由F3H进化而来, 也和伞形科植物中既存在黄酮醇类成分, 又存在黄酮类成分的现象相符合(Li等2020c)。在下游的反应中, 二氢黄酮醇的4-羰基被还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)还原为黄烷3,4-二醇(原花色素), 另一个2-ODD花色素合成酶(anthocyanidin synthase, ANS), 催化原花色素C3羟基化生成花色素。这个羟基化反应的作用机制比较特殊, 过程中伴随着脱水消除反应(Wilmouth等2002) (图3)。除核心通路外, 2-ODD还可对黄酮类化合物的C6位进行羟基化修饰(Anzellotti和Ibrahim 2004)。最近Berim等(2015)在罗勒(*Ocimum basilicum*)中发现的ObF7ODM1 (*Ocimum ba-*

silicum flavone 7-O-demethylase 1), 能够催化黄酮类成分梔子宁B (gardenin B) C7位点去甲基化, 它和罂粟中的氧-去甲基酶(*O*-demethylase)的相似度要高于其他黄酮代谢中的2-ODD。但它的N端结构比较特殊和其它2-ODD的相似度都很低, 并且DNA全长可读框包含2个ATG密码子, 这对它特殊的生化功能至关重要。总之, 2-ODD广泛参与不同植物的黄酮类成分代谢过程(图2)。

5.3 2-ODD参与香豆素结构母核的形成

香豆素类成分(coumarins)是由苯丙氨酸衍生而来的次生代谢物, 具有极高的药用价值。目前, 已经鉴定了2个2-ODD羟基化酶参与香豆素的结构母核——苯骈 α -吡喃酮的形成。最初, Kai等(2008)发现了拟南芥中的F6'H1催化阿魏酰辅酶A

(feruloyl-CoA)生成6'羟基-阿魏酰辅酶A, 接着, 产物侧链自发旋转并脱水形成东莨菪亭(scopoletin), F6'H1在番薯(*Ipomoea batatas*)中也有报道, 被命名为IB1 (Matsumoto等2012) (图2)。之后, Vialart等(2012)在芸香(*Ruta graveolens*)中发现了C2'H (p-coumaroyl CoA 2'-hydroxylase), 它不仅能催化对香豆酰辅酶A邻位羟基化生成伞形花内酯(umbelliferone), 还具有F6'H1的活性, 但由于芸香中并没有显著的东莨菪亭的累积, 因此它在植物芸香内对香豆酰辅酶A具有高度专一性(图2)。番薯中的另一个参与香豆素代谢的IB2和它的功能类似, 而之后在欧洲防风草(*Pastinaca sativa*) (Roselli等2017)和药用植物白花前胡(*Peucedanum praeruptorum*) (Yao等2017)中鉴定的C2'H并没有明确表明具有催

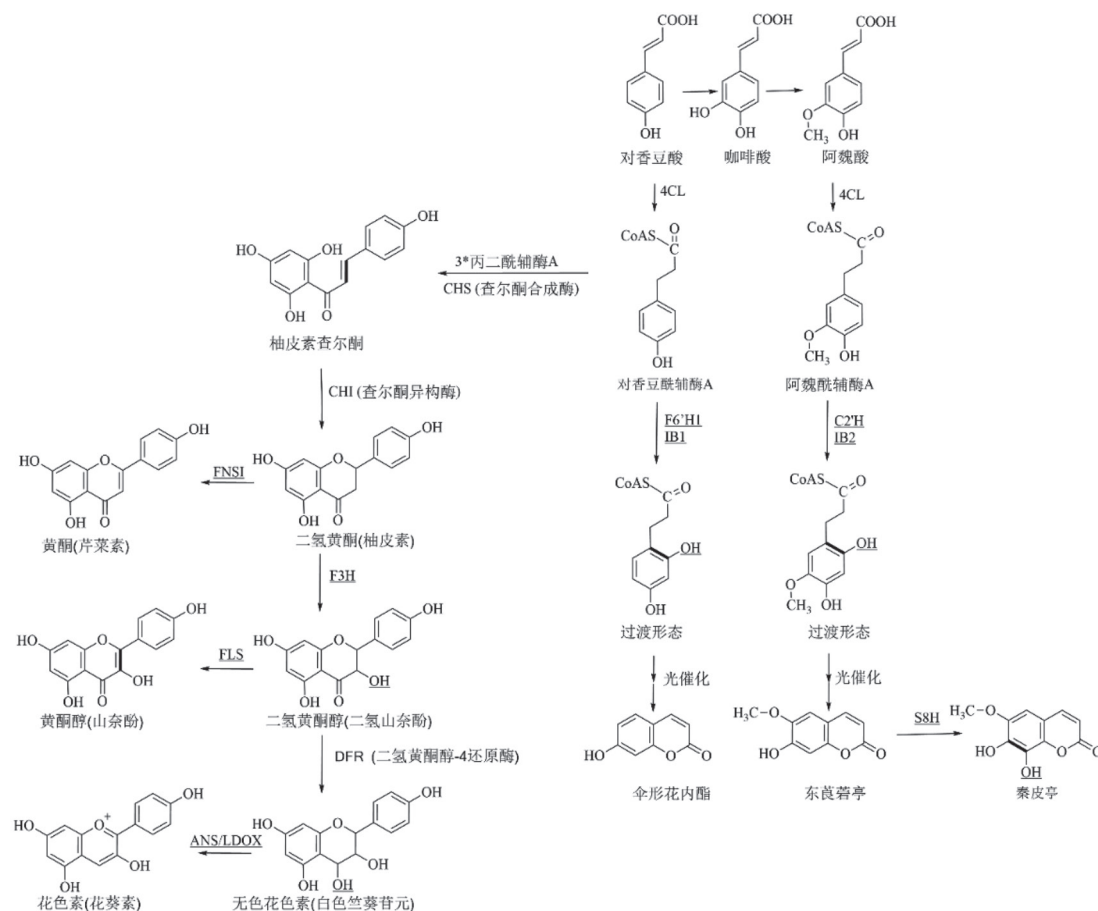


图2 黄酮和香豆素代谢过程

Fig. 2 Metabolic pathway of flavones and coumarins

下划线表示参与黄酮和香豆素代谢的2-ODD。

化阿魏酰辅酶A的功能。最近,在拟南芥中鉴定了一个具有独特功能2-ODD东莨菪亭8-羟基化酶(scopoletin 8-hydroxylase, S8H),可催化东莨菪亭生成秦皮亭(fraxetin) (Siwinska等2018)。

5.4 2ODD参与鬼臼毒素的生物合成

在桃儿七(*Sinopodophyllum hexandrum*)中发现的去氧鬼臼毒素合成酶(deoxypodophyllotoxin synthetase)能够催化C-C键的形成使亚太因(yatein)转化为去氧鬼臼毒素,形成鬼臼毒素的基本骨架(Lau和Sattely 2015)。Lazzarotto等(2019)通过对底物特异性的研究发现,亚太因的内酯环结构和三甲氧基结构对酶的活性有很大的影响,而含氧五元杂环发生改变时对酶的影响较小。吕敏(2020)发现适当的低温能够诱导去氧鬼臼毒素合成酶基因的表达,从而提高桃儿七中鬼臼毒素的含量,具体的作用机制尚未明确。

6 2-ODD参与生物碱类成分代谢

6.1 2-ODD参与吲哚类生物碱(indole alkaloids)的代谢

和水杨酸的调控过程类似,2-ODD参与生长素活性的调控。吲哚乙酸(indole acetic acid, IAA)调控植物的极性生长、叶序和花序以及其他生长发育相关的生理过程。从水稻突变体中鉴定的生长素双加氧酶(dioxygenase for auxin oxidation, DAO)催化吲哚乙酸的氧化反应,将其转化为没有活性的氧化吲哚乙酸(oxIAA) (Zhao等2013)。目前,这个反应详细的机制没有被阐明,可能是在羟基化反应之后电子发生了重排,因此,不饱和键移动,从而形成羰基,使整个结构更加稳定。而在长春花(*Catharanthus roseus*)中发现的长春花碱(vinblastine)和长春新碱(vincristine)属于单萜吲哚类生物碱,具有显著的抗癌活性,它们是由长春质碱(catharanthine)和文朵灵(vindoline)耦合形成的。其中,去乙酰文朵灵脱羧酶(desacetoxyvindoline-4-hydroxylase, D4H)参与文朵灵生物合成的倒数第二步,生成文朵灵的直接前体脱乙酰文朵灵(De Carolis和De Luca 1993)。

6.2 2-ODD参与苯并噁唑啉酮(benzoxazinoids, BXs)的代谢

苯并噁唑啉酮类生物碱是禾本科植物中一类重要的化感物质,主要参与对昆虫的抵抗。在玉米

中鉴定的BX6 (Frey等2003)和BX13 (Handrick等2016),前者将2,4-二羟基3-羰基苯并噁唑啉酮(2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one, DIBOA)转化为2,4,7-三羟基3-羰基苯并噁唑啉酮(2,4,7-trihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one, TRIBOA),后者将2,4-二羟基7-甲氧基3-羰基苯并噁唑啉酮(2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one, DIMBOA)转化为2,4,7-三羟基8-甲氧基3-羰基苯并噁唑啉酮(2,4,7-trihydroxy-8-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one, TRIMBOA),在不同的玉米品种中,食草动物啃食能显著诱导BX13的表达,二者主要参与对食草动物以及昆虫的抵御。BX13催化的羟基化反应具有特殊性,底物在羟基化的同时往往伴随着甲氧基的邻位重排。

6.3 2-ODD参与甾体糖苷类生物碱的代谢

甾体糖苷类生物碱(steroidal glycoalkaloids, SGAs)主要存在于茄科(*Solanaceae*)植物中,能够保护植物免受昆虫的侵扰。马铃薯(*Solanum tuberosum*)中的茄啉(solanidine)、番茄(*Solanum lycopersicum*)中的番茄次碱(tomatidine)和茄子(*Solanum melongena*)中的茄解啉(solasodine)均属于此类成分,三者均由胆固醇衍生而来。其中, GAME11 (glycoalkaloid metabolism 11) (Itkin等2013)或16DOX (St16DOX) (Nakayasu等2017)可催化22,26-二羟基胆固醇C16位点的羟基化,在三者生物合成中起重要作用。而Akiyama等(2021)在马铃薯中发现DPS (dioxygenase for potato solanidine synthesis)能直接催化苦茄碱(solamarine)形成茄啉。之后,茄啉、番茄次碱和茄解啉分别被多个糖基转移酶催化形成卡茄碱(α -chaconine)和茄碱(α -solanine)、番茄碱(α -tomatine)以及澳洲茄碱(α -solasonine)和澳洲茄边碱(α -solanargine)。Cárdenas等(2019)利用QTL技术在番茄栽培种和茄子栽培种中发现了GAME31 (glycoalkaloid metabolism 31),进一步通过序列相似性分析,在野生马铃薯(*Solanum chacoense*)发现了GAME32。GAME31在番茄栽培种中可催化苦味的番茄碱形成非苦味的羟基番茄碱(hydroxytomatine),而在茄子栽培种中则分别催化澳洲茄碱和澳洲茄边碱形成相应的羟基化产物。然而,在番茄的野生品种(*Solanum pennellii*)却并没有发现GAME31,这也进一步从分子层面解释了野生番茄更

苦的原因。GAME32能够催化卡茄碱和茄碱分别形成瘦素I (leptinine I)和瘦素II (leptinine II), 从而进一步形成具有抗马铃薯甲虫(colorado potato beetle)活性的勒帕茄碱I和II (leptine I and II), 而在马铃薯的栽培品种中, 并没有发现GAME32, 因此马铃薯栽培种对马铃薯甲虫敏感。GAME31和32的发现对提高番茄的食用口感以及开发马铃薯甲虫特效杀虫剂具有重要意义。

6.4 2-ODD参与植物缺铁响应

在响应铁元素缺乏的应答反应中, 禾本科植物会产生麦根酸(mugineic acid)作为植物铁载体来螯合土壤中的铁元素(Farrow和Facchini 2014)。Nakanishi等(2000)鉴定的2个不同的2-ODD (IDS2和IDS3), 它们能对2-去氧麦根酸(2-deoxymugineic acid)的不同位点进行羟基化反应来合成麦根酸, 使合成麦根酸的生化途径多样化。

6.5 2-ODD参与异喹啉类生物碱的代谢

异喹啉生物碱是最大的一类生物碱, 来自于苯丙氨酸或酪氨酸, 包括苄基异喹啉(benzylisoquinoline alkaloids, BIAs)、原小檗碱类等多个亚类。BIAs是一类由酪氨酸衍生而来的次生代谢物, 主要存在于罂粟科植物罂粟(*Papaver somniferum*)中, 其含有的吗啡(morphine)和可待因(codeine)是重要的镇痛剂(Farrow和Facchini 2014)。Hagel和Facchini (2010)利用DNA芯片技术鉴定了帝巴因6-*O*-去甲基酶(thebaine 6-*O*-demethylase, T6ODM)和可待因3-*O*-去甲基酶(codeine *O*-demethylase, CODM)。它们参与由帝巴因生成吗啡的代谢通路, 根据其作用顺序的不同, 可分为2条支路: (A)帝巴因→东罂粟碱→吗啡酮→吗啡; (B)帝巴因→可待因酮→可待因→吗啡。T6ODM和DAO类似, 作用时可能是因为发生了电子重排, 会生成羰基, 因此两条支路中都有还原酶COR的参与(图3)。罂粟碱7-*O*-去甲基酶(papaverine 7-*O*-demethylase, P7ODM)的发现进一步扩大了罂粟中2-ODD的范围, 它可将罂粟碱转化为pseudocodeine (Farrow和Facchini 2015)。在原阿片碱类生物碱的代谢过程中, 2-ODD对不同底物或者不同位点的开环反应导致此类成分结构的差异化。在上述T6ODM和CODM的鉴定过程中发现了另一个2-ODD (PODA), 但当时并未阐明其功

能(Hagel和Facchini 2010)。之后对PODA的鉴定明确了其具有的O-O去亚甲基化和O-去甲基化的能力, 可通过断裂O-CH₂-O桥来开打含氧杂环, 此外CODM和T6ODM也参与多种原阿片碱类生物碱的代谢, 包括普托品(protopine)和原小檗碱(protoberberine) (Farrow和Facchini 2013)。CODM对普托品的A环和B环上的双氧桥均有开环作用, 而PODA仅具有打开A环双氧桥的能力。

6.7 2-ODD参与其它生物碱的代谢

除上述种类外, 2-ODD还参与莨菪烷类生物碱(tropane alkaloids)和尖防己碱(acutumine)的生物合成。莨菪烷类生物碱主要存在于茄科植物中, 是一类具有致幻作用次生代谢物。2-ODD参与东莨菪碱(scopolamine)的生物合成, 莨菪碱6 β -羟基化酶(hyoscyamine 6 β -hydroxylase, H6H)催化莨菪碱6,7位点的环氧化形成东莨菪碱(Hashimoto和Yamada 1986, 1987)。尖防己碱(acutumine)是存在于防己科(*Menispermaceae*)植物中的一类含氯次生代谢物, Kim等(2020)利用RNA-seq和差异表达分析在防己科植物北美蝙蝠葛(*Menispermum canadense*)和风龙(*Sinomenium acutum*)中发现了参与尖防风碱生物合成最后一步反应的卤化酶DAH (dechloroacutumine halogenase)。DAH是首个在植物中被鉴定的卤化酶, 其体外酶活实验表明, 当底物为去氯尖防己碱(dechloroacutumine)和NaCl时, 产物为尖防己碱, 而底物为去氯尖防己碱和NaN₃时, 其产物为11-N₃-去氯尖防己碱(11-azido-dechloroacutumine), 这项研究也为叠氮类次生代谢物生物合成途径的发掘提供了基础。

7 2-ODD参与其它成分的代谢

7.1 2-ODD参与茉莉酸的代谢

茉莉酸(jasmonic acid, JA)是一类脂肪酸衍生物, 具有植物激素的功能, 参与植物的防御过程, 能够激活植物的免疫功能, 诱导多种次生代谢物的累积(Campos等2014)。JA在植物体内积累会严重影响植物生长, 因此其含量受到严格调控。Caarls等(2017)在拟南芥中发现了4个茉莉酸诱导氧化酶(jasmonate-induced oxygenases, JOXs), 能够将JA转化为没有活性的12-OH-JA。在拟南芥joxs突变体

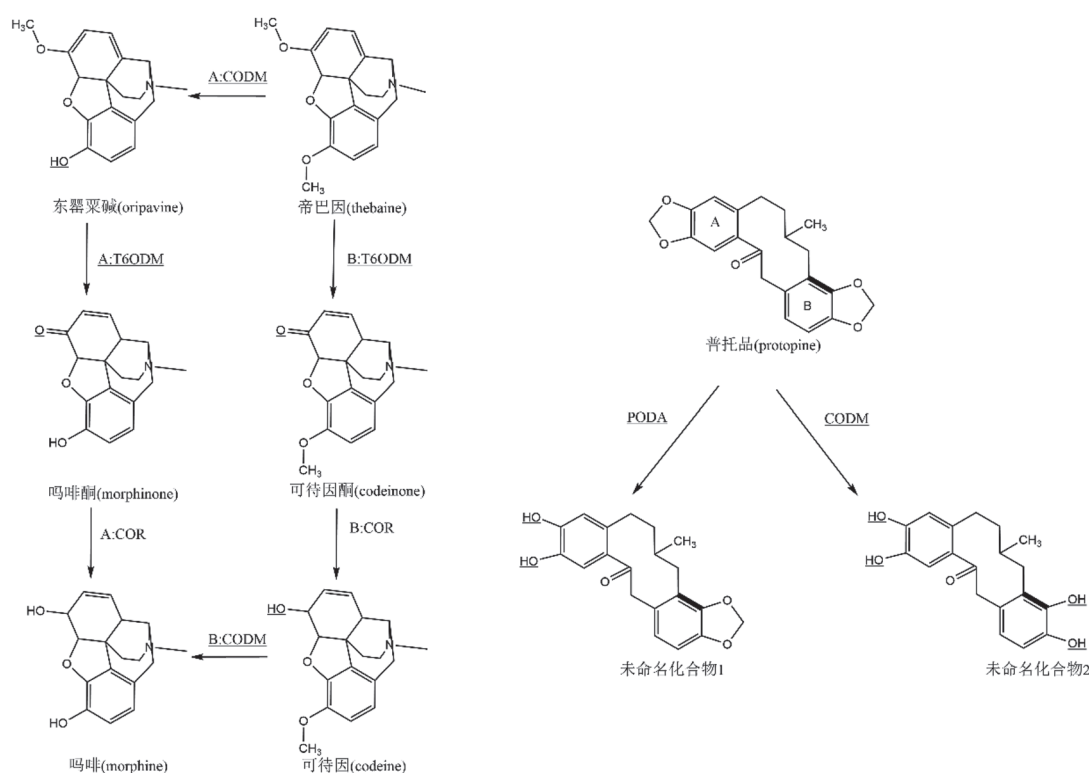


图3 异喹啉类生物碱部分代谢途径

Fig. 3 Metabolic pathway of isoquinoline alkaloids

下划线表示参与异喹啉类生物碱代谢的2-ODD, 根据Farrow和Facchini (2014)一文改画。

中, JA诱导的抗性基因表达量上调, 植株对真菌的抵抗能力增强, 但根和芽的生长受到影响。以JOX2为研究对象进行结构解析, 结果表明F157残基的侧链苯环和JA的苯环平行排列, 形成类似于 π - π 堆积作用, 对底物特异性及稳定性至关重要(Zhang等2021)

7.2 2-ODD参与乙烯的生物合成

乙烯是一类重要的植物激素, 既参与逆境胁迫下的生理生化过程, 也能促进果实的成熟。1-氨基-1-羧酸环丙烷氧化酶(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase, ACCO)催化乙烯的直接前体ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid)开环转化为乙烯(Hamilton等1991)。ACCO是一类独特的2-ODD, 因为它使用抗坏血酸作为共底物而不是2OG, 而ACC通过氨基和羧基以双齿形式和Fe(II)结合, 但它的核心功能域和其它2-ODD具有高度同源性(Clifton等2006)。

7.3 2-ODD参与脂肪族硫代葡萄糖苷的侧链二次修饰

硫代葡萄糖苷(glucosinolate)是一类含有N和S的次生代谢物, 主要存在于十字花科(*Brassicaceae*)植物中, 可保护植物免受昆虫的损伤, 是一类重要的防御成分(Farrow和Facchini 2014)。Kliebenstein等(2001)鉴定了一个拟南芥中的AOP3, 其功能是催化亚磺酰烷基硫代葡萄糖苷(methylsulfinylalkyl glucosinolate)的羟基化反应, 并伴随脱磺酰基, 从而生成羟烷基(hydroxyalkyl glucosinolate)基硫代葡萄糖苷, 而AOP2能够催化亚磺酰烷基硫代葡萄糖苷的脂肪侧链去饱和, 从而生成烯烷基硫代葡萄糖苷(alkenyl glucosinolate)。之后, Hansen等(2008)发现GSL-OH能够将烯基硫代葡萄糖苷(but-3-enyl glucosinolate)转化为相应的羟基化的烯基硫代葡萄糖苷(2-hydroxybut-3-enyl glucosinolate)。由于不同植物体内硫代葡萄糖苷类成分的组成具有差

异性, 因此, 一种仅存在于欧洲防风草中的硫代葡萄糖苷——甲硫烯烷基硫代葡萄糖苷(还原型萝卜硫苷)的生物合成过程最近才被阐明。GRS1 (glucoraphasatin synthase 1)催化底物侧链C3/C4去饱和, 从而生成甲硫烯烷基硫代葡萄糖苷(Kakizaki等2017)。因此, 2-ODD对于调控植物的防御反应具有重要意义。

8 展望

2-ODD参与植物体内大量代谢过程, 对植物的生长发育具有重要作用。同时, 其参与合成的次生代谢产物对人体具有极高的药用价值。随着高通量测序技术的快速发展, 越来越多植物的转录组以及基因组数据被公布。将已知2-ODD在多种生物的组学数据库中进行同源性分析, 同时利用不同的生物信息学手段加以筛选, 有利于在不同植物体内发掘调控药用成分代谢的2-ODD。比如, 陈跃华等(2015)提取了参薯块茎的总RNA, 根据NCBI上登录的植物花青素合成酶基因保守区段序列, 设计特异性引物PCR扩增得到参薯ANS基因的DNA序列, 从而为调控和增加花青素含量、改善膳食营养和创新参薯品种奠定了基础。通过添加不同底物的体外酶活实验, 可以进一步扩大2-ODD的作用范围, 这有利于缩短目标产物的代谢途径。还可利用多种分子生物学手段来改造药用植物, 比如将调控某些重要活性成分的2-ODD过表达, 从而使其能够更加高效地合成活性成分。在未来, 利用功能基因组学对参与药用植物活性成分代谢通路2-ODD的编码基因进行深入挖掘、鉴定和分离, 从而将其用合成生物学策略改造天然生产宿主, 或者异源宿主, 大规模生产药用活性成分, 这将为解决中药资源匮乏的困境提供一条重要可行的途径。

参考文献(References)

- Akiyama R, Watanabe B, Nakayasu M, et al (2021). The biosynthetic pathway of potato solanidanes diverged from that of spirosolanes due to evolution of a dioxygenase. *Nat Commun*, 12 (1): 1300
- Anzellotti D, Ibrahim RK (2004). Molecular characterization and functional expression of flavonol 6-hydroxylase. *BMC Plant Biol*, 4: 20–32
- Berim A, Kim MJ, Gang DR (2015). Identification of a unique 2-oxoglutarate-dependent flavone 7-*O*-demethylase completes the elucidation of the lipophilic flavone network in *basil*. *Plant Cell Physiol*, 56: 126–136
- Bredebach M, Matern U, Martens S (2011). Three 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase activities of *Equisetum arvense* L. forming flavone and flavonol from (2*S*)-naringenin. *Phytochemistry*, 72 (7): 557–563
- Brewer PB, Yoneyama K, Filardo F (2016). *LATERAL BRANCHING OXIDOREDUCTASE* acts in the final stages of strigolactone biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113 (22): 6301–6306
- Britsch L (1990). Purification and characterization of flavone synthase I, a 2-oxoglutarate-dependent desaturase. *Arch Biochem Biophys*, 282 (1): 152–160
- Britsch L, Grisebach H (1986). Purification and characterization of (2*S*)-flavanone 3-hydroxylase from *Petunia hybrida*. *Eur J Biochem*, 156: 569–577
- Britsch L, Ruhnau-Brich B, Forkmann G (1992). Molecular cloning, sequence analysis, and *in vitro* expression of flavanone 3 beta-hydroxylase from *Petunia hybrida*. *J Biol Chem*, 267: 5380–5387
- Caarls L, Elberse J, Awwanah M, et al (2017). *Arabidopsis* JASMONATE-INDUCED OXYGENASES down-regulate plant immunity by hydroxylation and inactivation of the hormone jasmonic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 114 (24): 6388–6393
- Campos ML, Kang JH, Howe GA (2014). Jasmonate-triggered plant immunity. *J Chem Ecol*, 40: 657–675
- Cárdenas PD, Sonawane PD, Heinig U, et al (2019). Pathways to defense metabolites and evading fruit bitterness in genus *Solanum* evolved through 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases. *Nat Commun*, 10: 1–13
- Chen YH, Xu Y, Wu WY, et al (2015). Cloning and analysis of differential expression of *DaANS* gene in *Dioscorea alata*. *Plant Physiol J*, 51 (6): 853–859 (in Chinese with English abstract) [陈跃华, 许云, 吴文婧等(2015). 参薯 *DaANS*基因克隆及表达差异分析. *植物生理学报*, 51 (6): 853–859]
- Chiang HH, Hwang I, Goodman HM (1995). Isolation of the *Arabidopsis* *GA4* locus. *Plant Cell*, 7 (2): 195–201
- Cho JN, Ryu JY, Jeong YM, et al (2012). Control of seed germination by light-induced histone arginine demethylation activity. *Dev Cell*, 22 (4): 736–748
- Clifton IJ, McDonough MA, Ehrismann D, et al (2006). Structural studies on 2-oxoglutarate oxygenases and related double-stranded beta-helix fold proteins. *J Inorg Bio-*

- chem, 100 (4): 644–669
- De Carolis E, De Luca V (1993). Purification, characterization, and kinetic analysis of a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase involved in vindoline biosynthesis from *Catharanthus roseus*. J Biol Chem, 268 (8): 5504–5511
- De Carolis E, De Luca V (1994). 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase and related enzymes: biochemical characterization. Phytochemistry, 36 (5): 1093–1107
- Duan HC, Wei LH, Zhang C, et al (2017). ALKBH10B is an RNA N^6 -methyladenosine demethylase affecting *Arabidopsis* floral transition. Plant Cell, 29 (12): 2995–3011
- Dutta A, Choudhary P, Caruana J, et al (2017). JMJ27, an *Arabidopsis* H3K9 histone demethylase, modulates defense against *Pseudomonas syringae* and flowering time. Plant J, 91 (6): 1015–1028
- Falnes PØ, Johansen RF, Seeberg E (2002). AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in *Escherichia coli*. Nature, 419 (6903): 178–182
- Farrow SC, Facchini PJ (2013). Dioxygenases catalyze *O*-demethylation and *O,O*-demethylenation with widespread roles in benzylisoquinoline alkaloid metabolism in *Opium poppy*. J Biol Chem, 288 (40): 28997–29012
- Farrow SC, Facchini PJ (2014). Functional diversity of 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenases in plant metabolism. Front Plant Sci, 5: 524
- Farrow SC, Facchini PJ (2015). Papaverine 7-*O*-demethylase, a novel 2-oxoglutarate/ Fe^{2+} -dependent dioxygenase from *Opium poppy*. FEBS Lett, 589: 2701–2706
- Ferreira MLF, Emiliani J, Rodriguez EJ, et al (2015). The identification of maize and *Arabidopsis* type I flavone synthases links flavones with hormones and biotic interactions. Plant Physiol, 169 (2): 1090–1107
- Flashman E, Schofield CJ (2007). The most versatile of all reactive intermediates? Nat Chem Biol, 3 (2): 86–87
- Frey M, Huber K, Park WJ, et al (2003). A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase is integrated in DIMBOA-biosynthesis. Phytochemistry, 62 (3): 371–376
- Gao XH, Fu XD (2018). Research progress for the gibberellin signaling and action on plant growth and development. Biotechnol Bull, 34 (7): 1–13 (in Chinese with English abstract) [高秀华, 傅向东(2018). 赤霉素信号转导及其调控植物生长发育的研究进展. 生物技术通报, 34 (7): 1–13]
- Gebhardt Y, Witte S, Forkmann G, et al (2005). Molecular evolution of flavonoid dioxygenases in the family Apiaceae. Phytochemistry, 66 (11): 1273–1284
- Gebhardt YH, Witte S, Steuber H, et al (2007). Evolution of flavone synthase I from parsley flavanone 3 beta-hydroxylase by site-directed mutagenesis. Plant Physiol, 144 (3): 1442–1454
- Gorres KL, Raines RT (2010). Prolyl 4-hydroxylase. Crit Rev Biochem Mol Biol, 45 (2): 106–124
- Hagel JM, Facchini PJ (2010). Dioxygenases catalyze the *O*-demethylation steps of morphine biosynthesis in *Opium poppy*. Nat Chem Biol, 6 (4): 273–275
- Hamilton AJ, Bouzayen M, Grierson D (1991). Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast. Proc Natl Acad Sci USA, 88 (16): 7434–7437
- Han XJ, Wu YF, Gao S, et al (2014). Functional characterization of a *Plagiochasma appendiculatum* flavone synthase I showing flavanone 2-hydroxylase activity. FEBS Lett, 588 (14): 2307–2314
- Handrick V, Robert CA, Ahern KR, et al (2016). Biosynthesis of 8-*O*-methylated benzoxazinoid defense compounds in maize. Plant Cell, 28 (7): 1682–1700
- Hangasky JA, Taabazuing CY, Valliere MA, et al (2013). Imposing function down a (cupin)-barrel: secondary structure and metal stereochemistry in the α KG-dependent oxygenases. Metallomics, 5 (4): 287–301
- Hansen BG, Kerwin RE, Ober JA, et al (2008). A novel 2-oxoacid-dependent dioxygenase involved in the formation of the goiterogenic 2-hydroxybut-3-enyl glucosinolate and generalist insect resistance in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 148 (4): 2096–2108
- Harborne JB, Williams CA (2000). Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry, 55 (6): 481–504
- Hashimoto T, Yamada Y (1986). Hyoscyamine 6 beta-hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase in alkaloid-producing root cultures. Plant Physiol, 81 (2): 619–625
- Hashimoto T, Yamada Y (1987). Purification and characterization of hyoscyamine 6 beta-hydroxylase from root cultures of *Hyoscyamus niger* L. hydroxylase and epoxidase activities in the enzyme preparation. Eur J Biochem, 164 (2): 277–285
- Holton TA, Brugliera F, Tanaka Y (1993). Cloning and expression of flavonol synthase from *Petunia hybrida*. Plant J, 4 (6): 1003–1010
- Huang S, Zhang A, Jin JB, et al (2019). *Arabidopsis* histone H3K4 demethylase JMJ17 functions in dehydration stress response. New Phytol, 223 (3): 1372–1387
- Huong TT, Ngoc LNT, Kang H (2020). Functional characterization of a putative RNA demethylase ALKBH6 in *Arabidopsis* growth and abiotic stress responses. Int J Mol Sci, 21 (18): 6707

- Hutton JJ, Tappel AL, Udenfriend S (1967). Cofactor and substrate requirements of collagen proline hydroxylase. *Arch Biochem Biophys*, 118: 231–240
- Islam MS, Leissing TM, Chowdhury R, et al (2018). 2-Oxoglutarate-dependent oxygenases. *Annu Rev Biochem*, 87: 585–620
- Itkin M, Heinig U, Tzfadia O, et al (2013). Biosynthesis of antinutritional alkaloids in *Solanaceous* crops is mediated by clustered genes. *Science*, 341 (6142): 175–179
- Kai K, Mizutani M, Kawamura N, et al (2008). Scopoletin is biosynthesized via *ortho*-hydroxylation of feruloyl CoA by a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 55 (6): 989–999
- Kakizaki T, Kitashiba H, Zou Z, et al (2017). A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase mediates the biosynthesis of glucoraphasatin in *Radish*. *Plant Physiol*, 173 (3): 1583–1593
- Kawai Y, Ono E, Mizutani M (2014). Evolution and diversity of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily in plants. *Plant J*, 78 (2): 328–343
- Kim CY, Mitchell AJ, Glinkerman CM, et al (2020). The chloroalkaloid (–)-acutumine is biosynthesized via a Fe(II)- and 2-oxoglutarate-dependent halogenase in *Menispermaceae* plants. *Nat Commun*, 11 (1): 1867
- Kliebenstein DJ, Lambrix VM, Reichelt M, et al (2001). Gene duplication in the diversification of secondary metabolism: tandem 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases control glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 13 (3): 681–693
- Konkina A, Klepadlo M, Lakehal A, et al (2021). An *Arabidopsis* prolyl 4 hydroxylase is involved in the low oxygen response. *Front Plant Sci*, 12: 637352
- Krebs C, Galonić-Fujimori D, Walsh CT, et al (2007). Non-heme Fe (IV)-oxo intermediates. *Acc Chem Res*, 40 (7): 484–492
- Lange T, Robatzek S, Frisse A (1997). Cloning and expression of a gibberellin 2 beta, 3 beta-hydroxylase cDNA from pumpkin endosperm. *Plant Cell*, 9 (8): 1459–1467
- Lau W, Sattely ES (2015). Six enzymes from mayapple that complete the biosynthetic pathway to the etoposide aglycone. *Science*, 349 (6253): 1224–1228
- Lazzarotto M, Hammerer L, Hetmann M, et al (2019). Chemoenzymatic total synthesis of deoxy-, *epi*-, and podophyllotoxin and a biocatalytic kinetic resolution of dibenzylbutyrolactones. *Angew Chem Int Ed Engl*, 58 (24): 8226–8230
- Lee HI, León J, Raskin I (1995). Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92 (10): 4076–4079
- Lee K, Park OS, Seo PJ (2018). JM30-mediated demethylation of H3K9me3 drives tissue identity changes to promote callus formation in *Arabidopsis*. *Plant J*, 95 (6): 961–975
- Lee YJ, Kim JH, Kim BG, et al (2008). Characterization of flavone synthase I from rice. *BMB Rep*, 41 (1): 68–71
- Li DD, Ni R, Wang PP, et al (2020c). Molecular basis for chemical evolution of flavones to flavonols and anthocyanins in land plants. *Plant Physiol*, 184 (4): 1731–1743
- Li H, Li D, Yang Z, et al (2020b). Flavones produced by mulberry flavone synthase type I constitute a defense line against the ultraviolet-B stress. *Plants (Basel)*, 9 (2): 215
- Li J, Li CY (2019). Seventy-year major research progress in plant hormones by Chinese scholars. *Sci Sini (Vitae)*, 49 (10): 1227–1281 (in Chinese with English abstract) [黎家, 李传友(2019). 新中国成立70年来植物激素研究进展. *中国科学: 生命科学*, 49 (10): 1227–1281]
- Li J, Ou-Lee TM, Raba R, et al (1993). *Arabidopsis* flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell*, 5 (2): 171–179
- Li Z, Jiang G, Liu X, et al (2020a). Histone demethylase SLJM16 promotes fruit ripening by removing H3K27 methylation of ripening-related genes in tomato. *New Phytol*, 227 (4): 1138–1156
- Liu P, Zhang S, Zhou B, et al (2019). The histone H3K4 demethylase JM16 represses leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 31 (2): 430–443
- Liu SX (2018). Functional analysis of stress-associated proteins and JmjC domain-containing histone demethylases in disease resistance against *Botrytis cinerea* against *Pst* DC3000 in tomato (dissertation). Hangzhou: Zhejiang University (in Chinese with English abstract) [刘士霞 (2018). 逆境胁迫相关蛋白和含有JmjC结构域的组蛋白去甲基化酶在番茄抗病中的功能研究(学位论文). 杭州: 浙江大学]
- Liu X, Cai WJ, Yin X, et al (2020). Two SLENDER AND CRINKLY LEAF dioxygenases play an essential role in rice shoot development. *J Exp Bot*, 71 (4): 1387–1401
- Lu F, Cui X, Zhang S, et al (2010). JM14 is an H3K4 demethylase regulating flowering time in *Arabidopsis*. *Cell Res*, 20 (3): 387–390
- Lü M (2020). Study on mechanism of temperature and light regulating growth and podophyllotoxin biosynthesis in *Sinopodophyllum hexandrum* (dissertation). Lanzhou: Gansu Agriculture University (in Chinese with English abstract) [吕敏(2020). 温光调控桃儿七生长和鬼臼毒素

- 生物合成的机制研究(学位论文). 兰州: 甘肃农业大学]
- Marcinkowski M, Pilżys T, Garbicz D, et al (2020). *Human and Arabidopsis* α -ketoglutarate-dependent dioxygenase homolog proteins-new players in important regulatory processes. *IUBMB Life*, 72 (6): 1126–1144
- Martens S, Forkmann G, Matern U, et al (2001). Cloning of parsley flavone synthase I. *Phytochemistry*, 58 (1): 43–46
- Martin DN, Proebsting WM, Hedden P (1999). The *SLENDER* gene of pea encodes a gibberellin 2-oxidase. *Plant Physiology*, 121 (3): 775–781
- Martinez S, Hausinger RP (2015). Catalytic mechanisms of Fe(II)- and 2-oxoglutarate-dependent oxygenases. *J Biol Chem*, 290 (34): 20702–20711
- Martínez-Pérez M, Aparicio F, López-Gresa MP, et al (2017). *Arabidopsis* m⁶A demethylase activity modulates viral infection of a plant virus and the m⁶A abundance in its genomic RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 114 (40): 10755–10760
- Matsumoto S, Mizutani M, Sakata K, et al (2012). Molecular cloning and functional analysis of the ortho-hydroxylases of *p*-coumaroyl coenzyme A/feruloyl coenzyme A involved in formation of umbelliferone and scopoletin in sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Phytochemistry*, 74: 49–57
- Matthews ML, Neumann CS, Miles LA, et al (2009). Substrate positioning controls the partition between halogenation and hydroxylation in the aliphatic halogenase, SyrB2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106 (42): 17723–17728
- Mori N, Nomura T, Akiyama K (2020). Identification of two oxygenase genes involved in the respective biosynthetic pathways of canonical and non-canonical strigolactones in *Lotus japonicus*. *Planta*, 251 (2): 40
- Nakanishi H, Yamaguchi H, Sasakuma T, et al (2000). Two dioxygenase genes, *Ids3* and *Ids2*, from *Hordeum vulgare* are involved in the biosynthesis of mugineic acid family phytosiderophores. *Plant Mol Biol*, 44 (2): 199–207
- Nakayasu M, Umemoto N, Ohyama K, et al (2017). A dioxygenase catalyzes steroid 16 α -hydroxylation in steroidal glycoalkaloid biosynthesis. *Plant Physiology*, 175 (1): 120–133
- Park S, Kim DH, Park BR, et al (2019). Molecular and functional characterization of *Oryza sativa* flavonol synthase (OsFLS), a bifunctional dioxygenase. *J Agric Food Chem*, 67 (26): 7399–7409
- Roach PL, Clifton IJ, Fülöp V, et al (1995). Crystal structure of isopenicillin N synthase is the first from a new structural family of enzymes. *Nature*, 375 (6533): 700–704
- Roselli S, Olry A, Vautrin S, et al (2017). A bacterial artificial chromosome (BAC) genomic approach reveals partial clustering of the furanocoumarin pathway genes in parsnip. *Plant J*, 89 (6): 1119–1132
- Shen Y, Conde E Silva N, Audonnet L, et al (2014). Over-expression of histone H3K4 demethylase gene JM15 enhances salt tolerance in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci*, 5: 290
- Silverstone AL, Sun T (2000). Gibberellins and the green revolution. *Trends Plant Sci*, 5 (1): 1–2
- Siwinska J, Siatkowska K, Olry A, et al (2018). Scopoletin 8-hydroxylase: a novel enzyme involved in coumarin biosynthesis and iron-deficiency responses in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 69 (7): 1735–1748
- Soares VL, Rodrigues SM, de Oliveira TM, et al (2011). Unraveling new genes associated with seed development and metabolism in *Bixa orellana* L. by expressed sequence tag (EST) analysis. *Mol Biol Rep*, 38 (2): 1329–1340
- Spribille R, Forkmann G (1984). Conversion of dihydroflavonols to flavonols with enzyme extracts from flower buds of *Matthiola incana* R. *Br. Z Naturforsch C*, 39 (7–8): 714–719
- Thomas SG, Phillips AL, Hedden P (1999). Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96 (8): 4698–4703
- Tian X, Ruan JX, Huang JQ, et al (2018). Characterization of gossypol biosynthetic pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 115 (23): 5410–5418
- Vialart G, Hehn A, Olry A, et al (2012). A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase from *Ruta graveolens* L. exhibits *p*-coumaroyl CoA 2'-hydroxylase activity (C2'H): a missing step in the synthesis of umbelliferone in plants. *Plant J*, 70 (3): 460–470
- Vigani G, Morandini P, Murgia I (2013). Searching iron sensors in plants by exploring the link among 2'-OG-dependent dioxygenases, the iron deficiency response and metabolic adjustments occurring under iron deficiency. *Front Plant Sci*, 4: 169
- Wilmouth RC, Turnbull JJ, Welford RW, et al (2002). Structure and mechanism of anthocyanidin synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Structure*, 10 (1): 93–103
- Yang H, Han Z, Cao Y, et al (2012). A companion cell-dominant and developmentally regulated H3K4 demethylase controls flowering time in *Arabidopsis* via the repression of *FLC* expression. *PLOS Genet*, 8 (4): e1002664
- Yao R, Zhao Y, Liu T, et al (2017). Identification and functional characterization of a *p*-coumaroyl CoA 2'-hydroxylase

- involved in the biosynthesis of coumarin skeleton from *Peucedanum praeruptorum* Dunn. *Plant Mol Biol*, 95 (1-2): 199–213
- Yoneyama K, Akiyama K, Brewer PB, et al (2020). Hydroxyl carlactone derivatives are predominant strigolactones in *Arabidopsis*. *Plant Direct*, 4 (5): e00219
- Zhang K, Halitschke R, Yin C, et al (2013). Salicylic acid 3-hydroxylase regulates *Arabidopsis* leaf longevity by mediating salicylic acid catabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110 (36): 14807–14812
- Zhang X, Wang D, Elberse J, et al (2021). Structure-guided analysis of *Arabidopsis* JASMONATE-INDUCED OXY-GENASE (JOX) 2 reveals key residues for recognition of jasmonic acid substrate by plant JOXs. *Mol Plant*, 14 (5): 820–828
- Zhang Y, Zhao L, Zhao J, et al (2017). *S5H/DMR6* encodes a salicylic acid 5-hydroxylase that fine-tunes salicylic acid homeostasis. *Plant Physiol*, 175 (3): 1082–1093
- Zhao Z, Zhang Y, Liu X, et al (2013). A role for a dioxygenase in auxin metabolism and reproductive development in rice. *Dev Cell*, 27 (1): 113–122
- Zhou L, Tian S, Qin G (2019). RNA methylomes reveal the m⁶A-mediated regulation of DNA demethylase gene *SID-ML2* in tomato fruit ripening. *Genome Biol*, 20 (1): 156