

香雪兰花色花香物质合成和调控研究进展

张佳, 李月庆, 单晓彤, 王丽, 高翔

(东北师范大学生命科学学院分子表观遗传学教育部重点实验室, 长春 130024)

摘要: 花香和花色是花卉作物重要的观赏性状, 是决定花卉品质、影响花卉经济价值的关键因素, 因此, 培育花色丰富、花香怡人的花卉新品种长期以来都是园艺工作者的主要育种目标, 香雪兰作为球根切花品种的代表其花朵颜色鲜艳、香气怡人, 是研究植物花色花香的良好材料, 本文综述了香雪兰花色花香合成代谢通路以及转录调控的研究进展, 重点介绍了控制香雪兰花色苷和萜类物质合成的关键结构基因、转录因子的功能和转录调控网络, 同时展望了花色苷和萜类物质合成的潜在应用前景。

关键词: 花色; 花香; 转录调控

The biosynthesis and regulation of floral volatile organic compounds and pigments in *Freesia hybrida*

ZHANG Jia, LI Yueqing, SHAN Xiaotong, WANG Li, GAO Xiang

(Key Laboratory of Molecular Epigenetics of MOE, School of Life Sciences, Northeast Normal University, Changchun 130024)

Abstract: Floral fragrance and flower color are important ornamental traits of flower crops, which are key factors that determine flower quality and affect flower economic values. Therefore, cultivating new flower varieties with rich floral colors and pleasant flowers has long been the main breeding goal of horticulturists. As a representative of bulb cut flower varieties, *Freesia hybrida* has bright flowers and pleasant aroma. This paper reviews the metabolic pathways and transcriptional regulation networks of the floral pigments and volatile organic compounds, and the potential applications of anthocyanin and terpenoids synthesis is also prospected.

Key words: flower color; flower scent; transcriptional regulation.

在植物的演化过程中, 花器官是重要的性状变革, 极大地促进了被子植物的繁荣。为了保证有性繁殖, 被子植物进化出了复杂的花部器官特征, 如花色、花香、花型和花蜜等, 这些特征通常被称为传粉综合症^[1], 其中花色花香是重要的观赏形状, 是决定花卉品质的重要因素, 因此解析花色花香之间的关系具有重要意义。

花色是观赏植物最重要的特征之一, 一般来说, 花朵中的色素可分为叶绿素 (Chlorophyll)、类黄酮 (Flavonoid)、类胡萝卜素 (Carotenoid) 和甜菜碱 (Betaine)^{[2][3]}。甜菜碱虽然可以赋予花朵红、橙、黄等

收稿日期: 2023-12-29 修回日期: 2024-04-10 网络出版日期:

URL:

第一作者研究方向为植物分子遗传学, E-mail: zhangj656@nenu.edu.cn

通信作者: 高翔, 研究方向为经济作物重要农艺性状转录调控网络解析, E-mail: gaoliang424@163.com

王丽, 研究方向为植物花香花色代谢, 真菌免疫学, 肿瘤血管发生机制, E-mail: Wanglee57@163.com

基金项目: 国家自然科学基金(31972445); 国家自然科学基金(31670382)

Foundation projects: The National Natural Science Foundation of China (31972445); The National Natural Science Foundation of China (31670382)

颜色，但仅存在于石竹目中，并且与花青素相互排斥^{[4][5]}。黄酮类化合物则存在于各种植物组织或器官中，黄酮类化合物赋予大多数植物的花黄色、红色、紫色和蓝色。类胡萝卜素与类黄酮共同存在决定了自然界中绝大多数花朵的颜色。类黄酮不仅负责参与植物的着色也参与了多种生物学过程，例如吸引传粉昆虫^[6]，抵御病虫害^[7]，适应紫外辐射等^[8]。迄今为止，已鉴定出 6000 多种黄酮类化合物^[9]，主要分为异黄酮、黄酮、黄酮醇、黄烷醇和花青素、鞣红、橙酮等，其中花青素是花卉和水果中最常见的色素^[10-13]。花青素的生物合成受各种环境因素，例如强光照会促进花青素的积累^{[14][15]}，而低温则促进切花牡丹花青素的积累^[16]，液泡 pH 值也会影响花青素的含量，当液泡 pH 值为酸性时花青素呈现出红色，中性为蓝色，碱性则为浅黄色^[17]，此外植物激素对于花青素的合成也具有复杂的调控作用^{[18][19]}。

花香的起源是生物进化中的一个重要事件，花香作为吸引传粉者的嗅觉信号通过介导植物与传粉者互动影响物种形成，是被子植物繁荣的重要驱动力^[1]。此外，花香在抵抗生物和非生物胁迫中也发挥着重要作用。花香是挥发性有机小分子（volatile organic compounds, VOC）的动态混合物，根据其独立的生物合成来源途径，主要可分为萜烯类（terpenes）、苯类/苯丙素类（benzenoid aromatics）和脂肪酸衍生物（fatty acid derivatives）。其中相对低分子量的萜烯（如 10 碳单萜烯和 15 碳倍半萜）的种类最多。花香的生物合成也受到各种环境因素的影响，例如光照会促进花香释放^[20]，高温会加快挥发物的释放^[21]，不同的激素则会对花香产生不同的效果。

香雪兰（*Freesia hybrida*），又名小苍兰，是鸢尾科香雪兰属的多年生草本植物，Klatt 于 1866 年建立了该属，香雪兰属植物主要分布在南非开普省南部地区，多数属内物种集中发现于北纬 33 度附近，生长在干燥的沙质平原到河流边缘。按照其原生习性，香雪兰属植物通常在秋季发芽，在冬季温度为 8℃至 10℃时开花^[22]。现有记录表明：香雪兰最早于 18 世纪开始在欧洲种植，并在 19 世纪下半叶成为广受欢迎的园艺植物。Burman 于 1766 年对香雪兰进行了描述^[23]，直到 1866 年，香雪兰才被描述为一个独特的属，1874 年 *F. Leichtlinii* 被发现后，该属才开始吸引园艺学家的兴趣，香雪兰的种植也变得更加普遍^[24]。对质体 DNA 序列系统发育分析表明：香雪兰属的 16 个野生种可分为两个亚属，其中 *F. refracta*, *F. speciosa*, *F. alba subsp. laxa*, *F. grandiflora*, *F. andersoniae*, *F. corymbosa*, *F. verrucosa*, *Freesia sparrmannii*, *Freesia viridis* 为一个亚属，*Freesia fucata*, *Freesia marginata*, *Freesia occidentalis*, *Freesia caryophyllacea*, *Freesia praececox*, *Freesia fergusoniae*, *Freesia leichtlinii* 为一个亚属。*Freesia hybrida*，被认为是 *Freesia leichtlinii* 和 *Freesia corymbosa* 经长期杂交及多倍化所产生的现代园艺品种的统称^{[25][26]}，2021 年俄罗斯亚热带科学中心对获得的 108 个杂交种香雪兰品质性状进行研究，其中七种被“State Register of Selection Achievements Authorized for Use for Production Purposes”授权用于生产，进一步推动了香雪兰花卉产业的发展^[27]。此外作为世界十大鲜切花之一，其花朵颜色丰富多彩，香气芬芳馥郁，是研究花色花香的良好材料。

1. 香雪兰花色和花香物质

香雪兰花朵颜色多种多样，花色最早是采用皇家园艺学会比色卡对其进行描述，通过对白色，橙黄色，紫红，蓝紫色系的香雪兰花色进行检测，结果表明香雪兰花色大致包含白色、橙色、红色、蓝色、紫色^[28]、此外还包括象牙色、黄色、粉色、绿色、双色等（图 1）。如图 2 香雪兰 Red River[®]中花器官的色素物质主要由花青素（飞燕草素、矮牵牛素、锦葵素、芍药素、矢车菊素衍生物）和黄酮醇（山奈酚和槲皮素衍生物）组成^[29]。除了 Red River[®]，对 ‘Red Passion’，‘Castro’，‘Gold River’，‘SN Chenghuang’，‘White River5’ 个花色不同的品种 的类黄酮（flavonoid）进行检测，结果表明 ‘White River’ 和 ‘Gold River’ 均未检测到花青素，而 ‘Red Passion’，‘Castro’，‘SN Chenghuang’ 的花青素含量随花瓣开放而增加^[30]，近年来随着基因工程的发展，基于 Illumina 平台对小苍兰花瓣转录组进行从头测序，并利用 EST-SSR 标记对小苍兰种质的多态性进行筛选，为花青素生物合成基因研究提供了有效方法^[31]。

此外，经过百余年的驯化，香雪兰的花香仍然得以留存，以栽培种香雪兰 Red River[®]为例，花香成分含量最多的是单萜类物质芳樟醇，其次是 α -松油醇，顺式罗勒烯，反式罗勒烯，1,8 桉叶素、 α -蒎烯，D-柠檬烯、 α -环柠檬醛、橙花叔醇挥发性萜类物质，二氢紫罗兰酮， β -紫罗兰酮等类胡萝卜素裂解产物也可以被检测到^[32]。在对 ‘Rosa Marie’，‘White Wing’，‘金童’，‘曙光’，‘香玫’，‘紫玉’ 和 ‘Royal Blue’ 的花香成分进行检测，结果表明 ‘Rosa Marie’ 主要挥发性成分为醇类和烯烃类，而其他六种则以芳樟醇为主要香气成分^[33]，此外对 ‘Ancona’，‘Calvados’，‘Summer Beach’，‘Pink Passion’，‘Versailles’，‘SN 2 Hongtaige’，‘SN Ruxiang’，‘SN Zimeigui’，‘Soleil’ 等 34 种园艺种挥发物进行检测，均包含单萜物质芳樟醇，此外还含有 D-柠檬烯，罗勒烯，月桂烯， α -松油醇，以及少量脂肪酸衍生物和苯丙素类物质^[34]，在对 ‘Shiny Gold’ 的花香检测中结果也表明芳樟醇是主要的挥发性化合物^[35]，这表明香雪兰最主要的挥发性成分为芳樟醇并且花香资源丰富。因此，香雪兰因其花色鲜艳、香气宜人受到广泛喜爱。

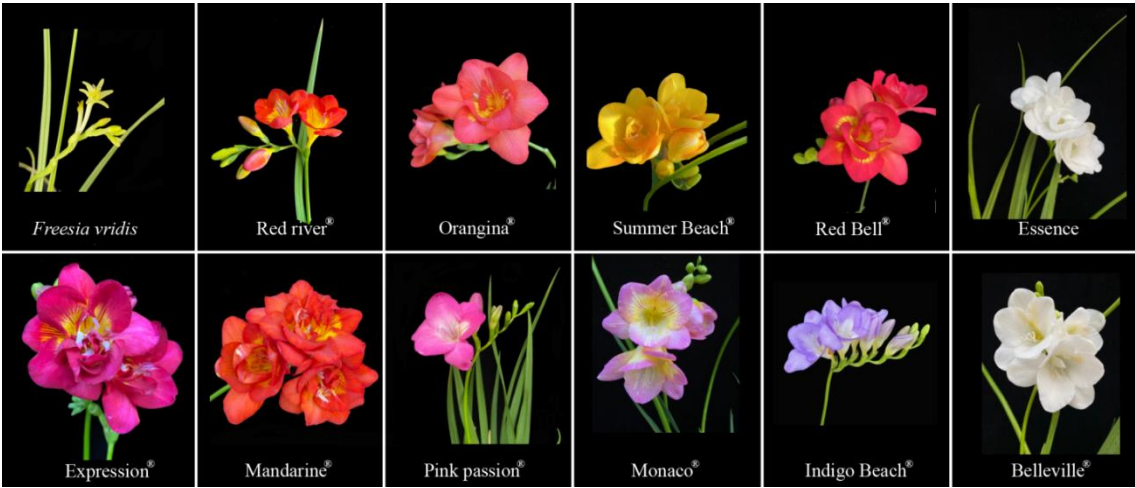


图 1： 不同花色的香雪兰的园艺种和野生种

Fig.1 Horticultural and wild species of fragrant snow orchids of different flower colors

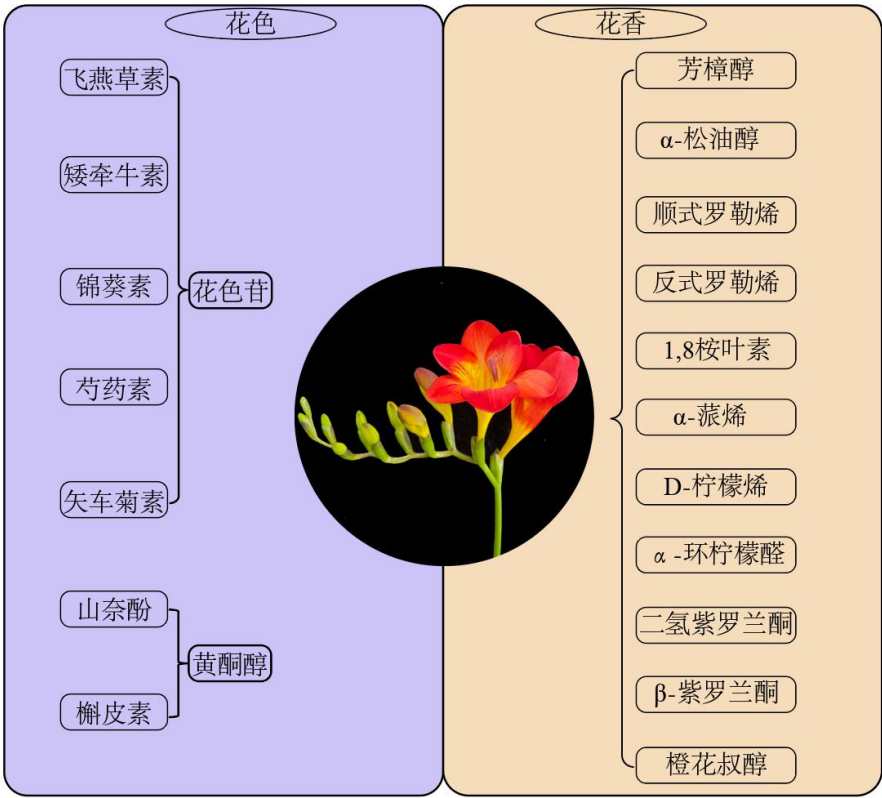
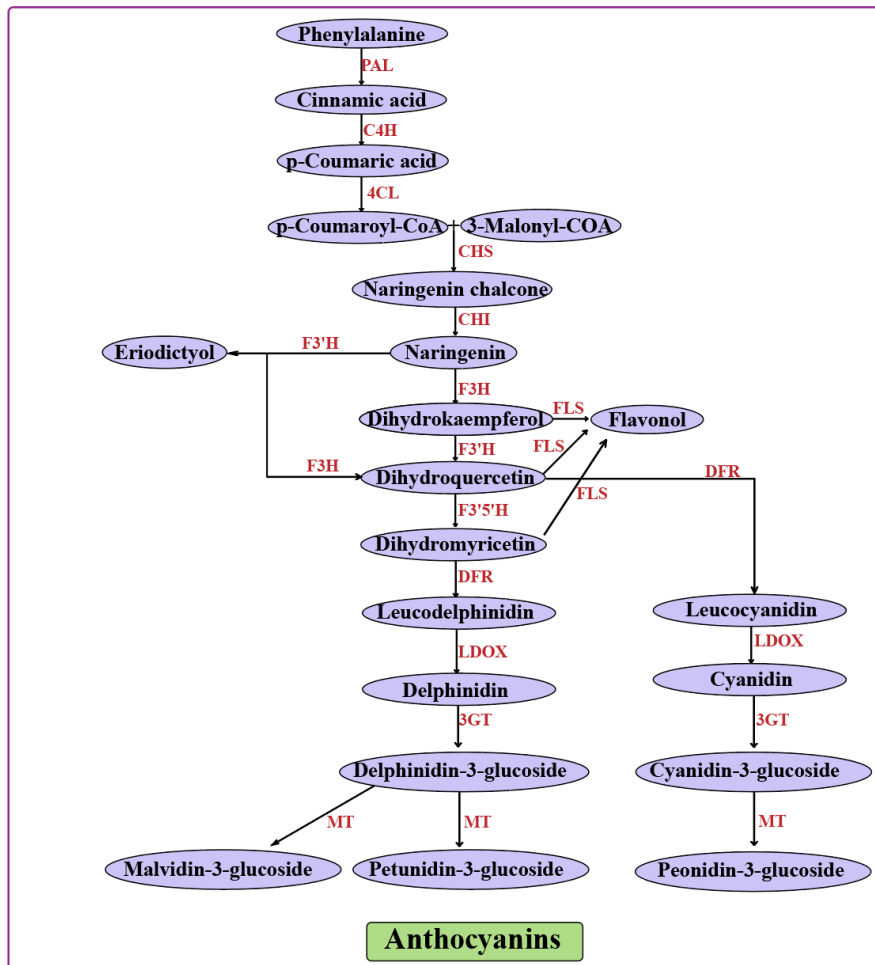


图 2：香雪兰 Red River®花器官中检测到的主要花色和花香物质

Fig.2 The main floral color and floral scent detected in the flower organs of Red River®

2. 花色物质合成的酶学基础

在过去的几十年里，以矮牵牛（*Petunia hybrida*）、金鱼草（*Antirrhinum majus* L.）、拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）和玉米（*Zea mays*）双子叶和单子叶植物为模型，解析了花青素的生物合成途径^{[36][37]}。研究表明：在单子叶植物香雪兰中也存在相似途径（图 3），花色苷的生物合成始于苯丙氨酸途径，经查耳酮合酶（CHS）查耳酮异构酶（CHI），黄烷酮 3-羟化酶（F3H），黄烷酮’3-羟化酶（F3’H）和黄酮-3’,5’-羟基化酶（F3’5’H）羟基化形成二氢槲皮素和二氢杨梅素，这些基因通常被认为是类黄酮生物合成途径中的早期基因（Early biosynthetic gene, EBG），最后二氢黄酮醇在二氢黄酮醇还原酶（DFR）、花青素合酶（ANS）和类黄酮 3-O-葡萄糖基转移酶（3GT）的作用下转化为有色花青素^{[38],[39][40]}。这些基因被认为是花青素生物合成途径中的晚期基因（Late biosynthetic genes, LBG）。此外，黄酮醇合酶（FLS）、无色花青素还原酶（LAR）和花青素还原酶（ANR）的作用分别导致类黄酮途径产生黄酮醇和原花青素。除了花青素外，黄酮醇对花色的形成也发挥着的辅助作用^{[41][42][43]}。



图注: Phenylalanine: 苯丙氨酸; Cinnamic acid: 肉桂酸; p-Coumaric acid: 对香豆酸; p-Coumaroyl-CoA: 香豆酰辅酶 A; Malonyl-CoA 丙二酰辅酶 A; Naringenin chalcone: 柚皮素查尔酮; Naringenin: Naringenin; Eriodictyol: 圣草酚; Dihydrokaempferol: 二氢山奈酚; Flavonol: 黄酮醇; Dihydroquercetin: 二氢槲皮素; Dihydromyricetin: 二氢杨梅素; Leucodelphinidin: 无色飞燕草素; Leucopelargonidin: 无色天竺葵素; Leucocyanidin 无色矢车菊素; Delphinidin: 飞燕草素; Cyanidin: 矢车菊素; Delphinidin-3-glucoside: 飞燕草素-3-O-葡萄糖苷; Cyanidin-3-glucoside: 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷; Malvidin-3-glucoside: 锦葵素-3-O-葡萄糖苷; Petunidin-3-glucoside: 矮牵牛素-3-O-葡萄糖; Peonidin-3-glucoside: 芍药素-3-O-葡萄糖苷。

图 3 香雪兰 Red River® 花色苷合成代谢通路

Fig.3 Anthocyanin anabolic pathway of Red River®

查耳酮合酶 (CHS) 是催化类黄酮生物合成途径中的第一个关键步骤。多重序列比对表明, *FhCHS1* 氨基酸序列中发现了保守的 CHS 活性位点残基和 CHS 特征序列。体外异源表达 *FhCHS1* 恢复了拟南芥 *tt4* 突变体种皮、子叶和下胚轴的色素沉着表型, 过表达 *FhCHS1* 的转基因矮牵牛花色从白色变为粉红色。综上 *FhCHS1* 在香雪兰黄酮类化合物的生物合成中发挥着重要作用^[44]。

相比于花色苷合成通路的上游结构基因, 下游结构基因发挥着更重要的作用, 其中二氢黄酮醇-4-还原酶作为 NADPH 依赖型还原酶超家族的一员, 在花青素生物合成途径起关键作用。二氢黄酮醇-4-还原酶是一种关键的氧化还原酶, 迄今为止, 已从多种双子叶植物中分离出 *DFR* 基因, 例如百脉根 (*Lotus japonicus*)

[45]、茶花 (*Camellia sinensis*) [46]、苜蓿 (*Medicago truncatula*) [47]、苹果 (*Malus domestica*) [48]、橙子 (*Citrus sinensis*) [49]、番薯 (*Ipomoea batatas*) [50]、银杏 (*Ginkgo biloba*) [51]和毛果杨 (*Populus trichocarpa*) [52]。此外在香雪兰 Red River®中也鉴定出 3 个 *DFR* 基因, 命名为 *FhDFR1*、*FhDFR2* 和 *FhDFR3*。*FhDFRs* 的过表达恢复了拟南芥 *tt3-1* 下胚轴颜色积累的表型, 表明 *FhDFRs* 可以在植物中将二氢槲皮素转化为无色花青素。体外酶促产物的高相液相色谱分析表明, *FhDFR1*、*FhDFR2* 和 *FhDFR3* 可以利用二氢槲皮素和二氢杨梅素生成无色花青素。相反, 转基因分析和生化分析均未证明 *FhDFRs* 蛋白可以将二氢山奈酚还原为无色天竺葵素。这些结果与香雪兰中检测到的花青素种类一致, 大量的飞燕草素衍生物伴有少量花青素衍生物, 而天竺葵素衍生物并未检测到。因此, 可以推断 *DFR* 的底物特异性是香雪兰中积累的花青素苷元类别的决定因素[53]。

花青素往往以糖苷的形式稳定地储存在液泡中, 因此糖基化对与花青素的合成至关重要。花青素糖苷是通常是由 UDP-类黄酮糖基转移酶 (UFGT) 催化合成的。在香雪兰中首先分离得到了编码 UFGT 的基因 *Fh3GT1*, 初步证明其参与花青素 3-O-葡萄糖苷的生物合成。*Fh3GT1* 可以识别多种类黄酮底物, UDP-葡萄糖和 UDP-半乳糖都可以作为 *Fh3GT1* 糖基供体, 但是 *Fh3GT1* 催化 UDP-半乳糖的活性相对较低。此外, *Fh3GT1* 能够以糖依赖性方式在 3-、4-和 7-位上糖基化飞燕草素。将 *Fh3GT1* 引入拟南芥 *UGT78D2* 突变体中, 成功恢复了因 *3GT* 功能丧失而导致的花青素和类黄酮醇无法积累的表型, 表明 *Fh3GT1* 在体内作为类黄酮 3-O-葡萄糖基转移酶发挥作用。此外, 矮牵牛稳转实验结果也表明: *Fh3GT1* 的过表达上调了矮牵牛类黄酮合成途径相关基因的表达。这些结果表明: *Fh3GT1* 是一种使用 UDP-葡萄糖作为糖基供体的类黄酮 3-O-糖基转移酶, 可能参与香雪兰中的类黄酮的糖基化修饰[27],[54]。

此外, 花青素的糖基化和类黄酮醇的糖基化可能是由不同的 3-O-葡萄糖基转移酶控制的, *Fh3GT1* 的表达模式和酶学特征与类黄酮醇的积累并不能很好地吻合, 因此从香雪兰中克隆出了 *Fh3GT1* 的旁系同源基因 *Fh3GT2*、*Fh3GT3*、*Fh3GT4*, 进一步实验证明只有 *Fh3GT2* 具有催化活性, 并且 *Fh3GT2* 主要催化山奈酚糖基化, 而 *Fh3GT1* 主要催化槲皮素和花青素的糖基化。此外, 原生质体瞬时转染实验表明: *Fh3GT2* 可以被调控类黄酮醇表达的转录因子 *FhMYBF1* 和调控花青素表达的转录因子 *FhPAP1* 激活, 而 *Fh3GT1* 只能被 *FhPAP1* 激活。综上香雪兰 3-O-葡萄糖基转移酶功能出现了一定程度的分化[55]。除了花青素 3-O-葡萄糖苷, 花青素 5-O-葡萄糖苷也发挥着至关重要的作用, 烟草过表达 *Fh5GT1* 和 *Fh5GT2* 增加了花青素的积累, 表明 UDP-5-O-葡萄糖基转基因酶在香雪兰花青素的糖基化中也发挥着重要的作用[56]。

除了花青素, 类胡萝卜素在香雪兰的着色也发挥着辅助作用, 藏红花醛和藏红花素也是类胡萝卜素的衍生物, 具有许多重要的应用价值。藏红花醛赋予藏红花辛辣的香气, 可用作食用香精[57][58]。藏红花酸和藏红花素对心血管疾病、神经系统疾病等多种疾病具有显著的药用和保健功能[59][60][61], 并且还可以抑制增殖恶性肿瘤细胞。与广泛的应用价值相反, 藏红花醛和藏红花仅在少数植物中合成, 因此探索更多具有合

成藏红花醛和藏红花素潜力的植物至关重要，香雪兰与藏红花同属于鸢尾科，香雪兰 Red River[®]可检测到藏红花醛和藏红花素。香雪兰中同样存在藏红花 CCD2 的同源基因。生化分析表明：FhCCD2 在 7、8 和 7'、8' 双键处裂解玉米黄质，生成藏红花醛和藏红花素生物合成所必需的中间体，为香雪兰花色的形成起到辅助作用^[62]。

3. 花色苷转录调控

除了上述结构基因外，植物中类黄酮生物合成所涉及的转录调控机制也得到了广泛的研究。三个不同的转录因子（TF）基因家族，包括 R2R3-MYB、碱性螺旋-环-螺旋（bHLH）和 WD40 重复序列（WD40），组成一个调节类黄酮代谢的蛋白复合物称为 MBW 复合物^[63]。拟南芥中至少有 6 个 MYB（即 PAP1、PAP2、MYB113、MYB114、TT2、MYB5）和 3 个 bHLH（即 TT8、GL3、EGL3）和 1 个 WD40（TTG1）调节 DFR 的表达已得到了很好的阐明^{[64][65][66][67]}。此外，在玉米、矮牵牛、烟草和其他被子植物中，尤其是双子叶植物中也鉴定出调节 DFR 表达的 MBW 复合物^{[36],[68],[69]}。近期在香雪兰中的工作中进一步证实了该调控模型在被子植物中的保守性，从香雪兰中分离出两个 IIIb Clade-bHLH 调节基因 *FhGL3L* 和 *FhTT8L*，并进行了功能鉴定。*FhGL3L* 和 *FhTT8L* 表达模式与花青素和原花青素积累具有不同的相关性。当 *FhGL3L* 在拟南芥中过表达时，可以通过上调拟南芥内源转录因子和下游结构基因来增强花青素的积累，而毛状体形成受到抑制，与 *AtGL2* 的下调相关。相比之下，*FhTT8L* 转基因品系中仅花青素和原花青素的积累得到加强。此外，*FhGL3L* 与 *AtPAP1*、*AtTT2* 和 *AtGL1* 相互作用，而 *FhTT8L* 仅与 *AtPAP1* 和 *AtTT2* 相互作用。*AtPAP1*-*FhGL3L*/*FhTT8L* 和 *AtPAP1*-*AtGL3*/*AtTT8* 均可以激活 *AtDFR* 的表达。当 *FhGL3L* 与强激活域 VP16 融合时，与 *AtGL1* 共转染时可以激活 *AtGL2* 的表达。因此，可以得出结论，在香雪兰中 bHLH 转录因子的功能可能存在差异，并且在类黄酮生物合成和毛状体的形成中可能存在复杂的相互作用和调控网络^[70]。

对香雪兰的 WD40 基因（命名为 *FhTTG1*）进行克隆与功能鉴定。*FhTTG1* 可以与 *FhbHLH* 蛋白（*FhTT8L* 和 *FhGL3L*）相互作用，构成 MBW 复合物。此外，发现 *FhTTG1* 向细胞核的运输依赖于 *FhbHLH* 转录因子。当 *FhTTG1* 与 MYB 和 bHLH 共转染时，可以显著激活花青素或原花青素生物合成相关基因启动子，这表明 *FhTTG1* 作为 MBW 复合体的成员来控制香雪兰中花青素、原花青素以及毛状体的生物合成^[71]。

MYB 调节基因 *FhPAP1* 分别在香雪兰、拟南芥和烟草中过表达时，可以激活 ABG 以及 TT8 进化枝基因 *FhTT8L*、*AtTT8* 和 *NtAN1* 的表达。并且 *FhPAP1* 可以与 *FhTT8L* 和 *FhTTG1* 相互作用形成保守的 MBW 复合物，与来自拟南芥的直系同源物共享相似的靶基因。不同的是，*FhPAP1* 比拟南芥和烟草中的同源物表现出更高的反式激活能力，这体现在其对 ABG 基因的强激活作用上。此外，我们发现 *FhPAP1* 可能是野生香雪兰物种驯化和快速进化过程中选择的基因，以产生强烈的花朵色素沉着。虽然 MBW 复合物的功能在

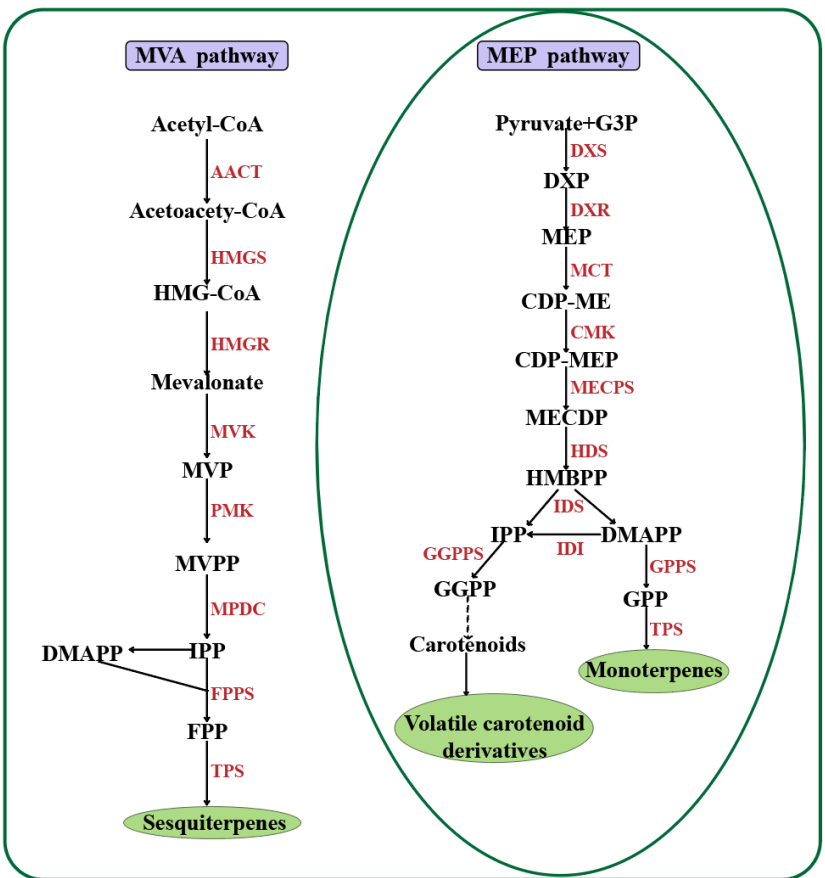
单子叶植物和核心双子叶植物之间高度保守, 但 MYB 转录因子的激活能力存在差异, 并在被子植物的花色素驯化和进化中发挥重要作用^[72]。

除了 *FhPAP1*, *FhMYB5* 也可以促进花青素和原花青素的合成, 香雪兰原生质体单独转染 *FhMYB5* 时, 晚期类黄酮生物合成基因 (例如 *FhDFR* 和 *FhLDOX*) 略有上调, 而当 *FhMYB5* 与 *FhTT8L* 或 *FhGL3L* 共转染时, 早期和晚期类黄酮生物合成基因均显著上调。此外, *FhMYB5* 在烟草和拟南芥中的过表达也可以显著上调类黄酮途径相关基因的表达^[74]。

图 4 香雪兰 Red River[®]花色苷合成转录调控 (引自 Li 等^[73])

4. 花香合成的酶学基础

发性萜类物质的合成一般可以分为三个阶段。首先是 IPP 和 DMAPP 这两种五碳前体的合成。在植物中存在两条不同的五碳前体的合成途径，分别是以乙酰辅酶 A 为前体物质的甲羟戊酸(mevalonic acid, MVA)途径和以丙酮酸和甘油醛 3 - 磷酸为前体的甲基赤藓醇 4-磷酸(methylerythritol phosphate, MEP)途径。IPP 和 DMAPP 形成之后，便可按不同比例在香叶基二磷酸合酶(GPPS)、法尼基焦磷酸合酶(FPPS)等酶的作用下缩合生成植物界多种多样的挥发性萜类化合物的直接底物——GPP、NPP 和 FPP 等^{[75],[76]}。最后，这些底物经萜类合酶(TPS)的催化，生成了结构丰富多样的挥发性萜类物质^{[77][78][79][80]}。目前，在 MVA 和 MEP 两种途径中都发现了一系列参与挥发性萜烯催化反应的酶。其中，萜烯合成酶（缩写为 TPS）被认为是将香叶基二磷酸（GPP）和法尼基二磷酸盐（FPP）底物分别转化为单萜烯和倍半萜的关键^{[81][82]}。



图注： AACT: 乙酰乙酰 CoA 硫解酶；HMGS: 羟甲基戊二酰 CoA 合酶；HMGR: 羟甲基戊二酰 CoA 还原酶；MK: MVA 激酶；PMK: 二氧磷基 MVA 激酶；MPD: MVA 焦磷酸脱羧酶；DXS: 脱氧木酮糖-5-磷酸合酶；DXR: 脱氧木酮糖磷酸盐还原异构酶；CMS: 4-二磷酸胞苷-2-C-甲基-D-赤藓醇酶；CMK: 4-二磷酸胞苷-2-C-甲基赤藓糖激酶；MCS: 2-甲基赤藓糖-2,4-环二磷酸合酶；HDS: 1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基 4-二磷酸合酶；IPK: 异戊烯基单磷酸激酶；IDI: 异戊烯基二磷酸异构酶；FPPS: 法尼基二磷酸合酶；GPPS: 香叶基二磷酸合酶；GGPPS: 香叶基香叶基二磷酸合酶；TPS: 萜烯合酶。

图 5 萜类物质合成代谢通路

Fig.5 Terpenoid anabolic pathway

根据序列和功能的相关性, TPS 基因家族在系统发育上分为七个亚家族 (TPS-a 至 TPS-h) [83]。迄今为止, TPS 基因已在从多种植物中被鉴定到 [84][85][86][87], 例如拟南芥 [86]、番茄 (*Solanum lycopersicum*) [80]、橙子 [87]、桉树 (*Eucalyptus robusta* Smith) [88]、葡萄 (*Vitis vinifera*) [89]、苹果 [90] 和基部被子植物无油樟 (*Amborella trichopoda*) [91]。香雪兰 Red River[®] 和 Ambiance 两个释放不同类别的挥发性化合物品种中分离得到了 8 个 *FhTPS* 基因。首先通过顶空固相微萃取收集并通过 GC/MS 分析技术鉴定了两个品种的花香成分, 结果表明: 在香雪兰花中总共检测到 31 种挥发性萜类物质, 其中 18 种来自 Red River[®], 19 种来自 Ambiance, Red River[®] 和 Ambiance 含量最多的成分均为芳樟醇。相对而言, Red River[®] 含有更多种类的单萜而 Ambiance 则含有更多种类的倍半萜。进一步的分析结果表明: 萜烯合酶 (TPS) 基因是决定两个品种中挥发性有机化合物差异的关键基因, 从而克隆了 Red River[®] 和 Ambiance 的 TPS 基因, 命名为 *FhTPS1-FhTPS8*, 其中 *FhTPS5* 的序列无法从 Ambiance 中克隆出来, 而 *FhTPS7* 则仅在 Ambiance 中获得。进一步的氨基酸序列比对结果表明: 所有 *FhTPS* 蛋白均含有保守的 DDXX(D/E)和(N,D)DX2(S,T,G)X3E(NSE/DTE)结构域, 这些结构域对于辅因子 Mg^{2+} 的结合以及 Mn^{2+} 催化萜烯生物合成至关重要。此外, *FhTPS1*、*FhTPS2*、*FhTPS3* 和 *FhTPS5* 还具有另一个保守基序 RRX8W, 该基序负责催化单萜环化。系统进化分析表明: *FhTPS6*、*FhTPS7* 和 *FhTPS8* 属于 TPS-a 进化枝; *FhTPS1*、*FhTPS2*、*FhTPS3* 和 *FhTPS5* 属于 TPS-b 进化枝, 而 *FhTPS4* 独立聚类到 TPS-g 进化枝中。通过体外酶活实验以和本氏烟草瞬转实验鉴定了 *FhTPS* 的功能。*FhTPS1* 将 GPP 转化为单萜芳樟醇; *FhTPS2* 主要将 GPP 转化为 α -松油醇等单萜类物质; *FhTPS8* 主要将 FPP 转化为 α -古芸烯等倍半萜类物质。而 *FhTPS4*、*FhTPS6* 和 *FhTPS7* 可以同时识别 GPP 和 FPP 生成单萜和倍半萜类物质, 其中 *FhTPS4* 可以催化 GPP 形成芳樟醇, 催化 FPP 形成橙花叔醇; *FhTPS6* 可以催化 GPP 形成月桂烯等单萜类物质, 催化 FPP 形成 α -芹子烯等倍半萜类物质; *FhTPS7* 可以催化 GPP 形成月桂烯等催化 FPP 形成可巴烯等倍半萜类物质; *FhTPS3*、*FhTPS5* 则不具有催化功能; *FhTPS2* 仅在 Red River[®] 表达, *FhTPS7* 在 Ambiance 表达量更高并且其对 FPP 的利用效率更高导致了 Ambiance 比 Red River[®] 释放出更多的倍半萜 [31]。

除了香雪兰栽培种外, 对 8 种野生种香雪兰的 TPS 基因进行了功能鉴定, 并深入地研究了主要 TPS 等位基因以及关键氨基酸残基的功能。如图 6 所示, 除了先前报道的现代园艺种中的 8 条 TPS 基因之外, 又发现了 7 种新 TPS 基因, 命名为 *FhTPS9-14*, 它们控制了不同香雪兰野生种中特异的萜类物质的合成。其中 *FhTPS9* 主要控制芳樟醇的合成, *TPS10* 主要控制 β -石竹烯的合成, *TPS11* 主要控制 α -法呢烯的合成, *TPS12* 主要控制蒎烯的合成, *TPS13* 主要控制柠檬烯的合成, *TPS14* 主要控制橙花醇的合成。其中 *TPS2* 和 *TPS10* 的等位变异显著地影响了其编码蛋白的催化活性, 并鉴定到了决定强催化能力的关键的氨基酸位点或基序。例如 8 个野生种中的 *TPS2* 在大多数位点具有相同的氨基酸序列, 然而 *FleTPS2* 能够利用底物 GPP 产生 α -松油醇, *FcaTPS2* 则几乎检测不到 α -松油醇的生成, 除了基因表达

差异以外，点突变实验结果表明：97 位和 205 位的氨基酸残基可能决定 α -松油醇的形成，证实了香雪兰属中等位基因确实存在功能差异的事实。TPS10 催化的 β -石竹烯在 8 种野生香雪兰物种中也表现出高度的释放差异，FviTPS10 基因插入一段 RIVVN 氨基酸序列，而 FviTPS10 中 RIVVN 的缺失显著抑制了其 β -石竹烯的形成。TPS 的等位变异不仅影响了它们的催化活性，还可以影响编码蛋白的催化产物的种类和各产物之间的比例，而且这种产物种类和比例的差异也是由少量的氨基酸位点决定，FspTPS6 的 287 位单个氨基酸变化显著影响了 FspTPS6 的产物组成。此外，415,416 位的氨基酸突变很大程度上影响了 FspTPS6 的功能。此外还选择 FfeTPS6 和 FcoTPS6，通过上述类似的策略进一步探索影响这 2 种蛋白功能的关键位点。结果表明，447 和 450 位点的氨基酸对于 α -芹子烯的形成至关重要，可能是 *F. fergusoniae* 和 *F. corymbosa* 之间倍半萜类物质释放差异的原因。

上述结果完善了香雪兰植物中的花香资源，对野生植物物种中 TPS 基因的功能多样性和进化的提出了新的见解，证明：TPS 基因的天然变体序列之间的微小氨基酸差异驱动了酶的催化活性和产物特异性，为阐明花香种间差异的遗传基础铺平了道路。此外，经过功能验证的 TPS 蛋白以及关键氨基酸位点的鉴定也将有助于建立具有芳香气味的花卉品种^[92]。

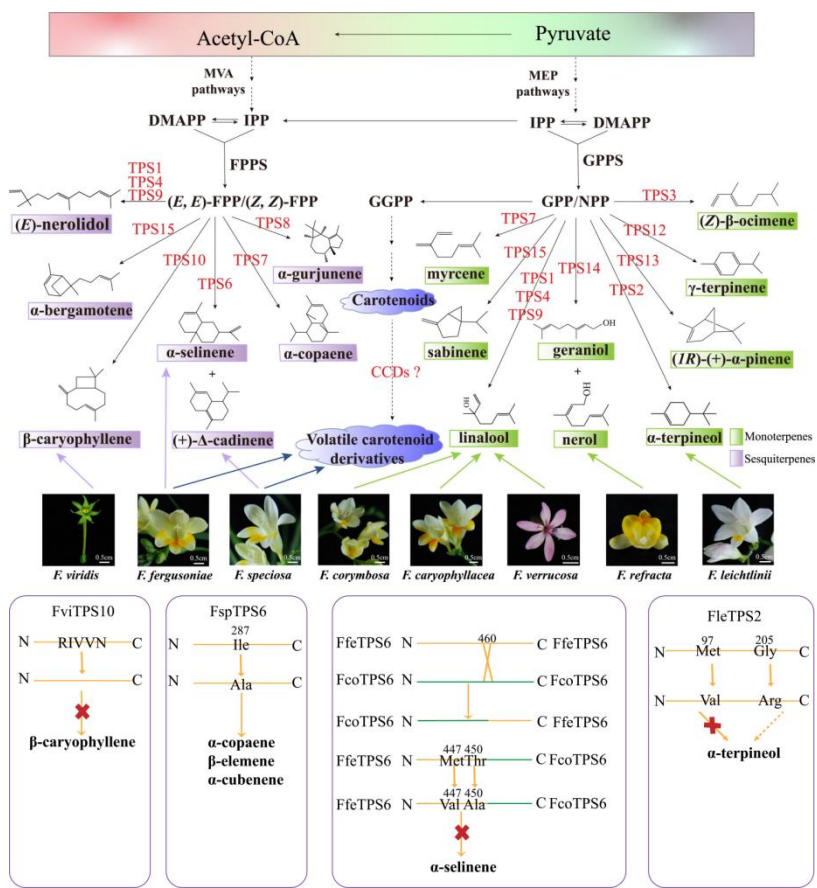


图 6 野生种香雪兰萜类物质合成代谢通路（引自 Bao 等^[92]稍有改动）

Fig.6 Anabolic pathway of terpenoids in the wild species of the Freesia genus (Quoted from Bao et al^[92] with slight changes)

5. 花色花香协同调控

前文提到，芳樟醇是香雪兰花香中含量最丰富的成分，而芳樟醇的形成由单萜合酶 *FhTPS1* 催化。以往的研究表明：调控 *TPS* 基因表达的转录因子种类众多，如 MYB^{[93][94]}, bHLH^[95], WRKY^[96], NAC^[97], bZIP^[98], AP2/ERF^{[99][100][101]}, SBP^[102] 和 SRS^[103] 等类型的转录因子。最近的研究表明在香雪兰花朵发育过程中两个 MYB 转录因子 *FhMYB21L1* 和 *FhMYB21L2* 与 *FhTPS1* 同步表达（如图 7），*FhMYB21L1* 和 *FhMYB21L2* 可与 *FhTPS1* 启动子中的 MYBCORE 位点结合直接激活 *FhTPS1* 表达。与 *FhMYB21L2* 相比，*FhMYC2* 表现出相反的表达模式，它的表达导致 *FhMYB21L2* 与 *FhTPS1* 启动子的结合减少，从而降低了共表达时的激活能力。在拟南芥中，AtMYB21 和 AtMYC2 调节因子均被证明可以激活倍半萜合酶基因的表达，并且 AtMYB21 和 AtMYC2 在芳樟醇合酶基因表达中的调节作用也得到证实，这意味着 MYB-bHLH 复合物在这些基因中具有保守功能。综上 MYB-bHLH 复合物可以协同调控 *FhTPS1* 基因表达，从而控制芳樟醇在开花过程中的释放。此外，*FhMYB21* 还可以调控黄酮醇合酶基因 *FhFLS2* 的表达，黄酮醇作为类黄酮的一种对花色的合成具有辅助作用。在香雪兰开花过程中发现了两个拷贝的 *FLS* 基因，*FhFLS1* 有助于早期花芽、花托和花萼中的黄酮醇生物合成，受到 SG7 家族的 MYB 转录因子 *FhMYBF* 的调节，而 *FhFLS2* 负责花朵发育晚期以及花瓣、雄蕊和雌蕊中的黄酮醇生物合成，由 SG19 家族的 MYB 转录因子 *FhMYB21L2* 调控。研究还发现：AtMYB21 和 AtMYB24 可以激活 *AtFLS1* 的表达，MYB21 对 *FLS* 基因调控在香雪兰和拟南芥两个物种中的保守性，同时也表明花色花香的合成可能受到同一个转录因子调控，为阐释花香花色协同调控关系具有重要的理论价值和应用价值^{[104][105]}。

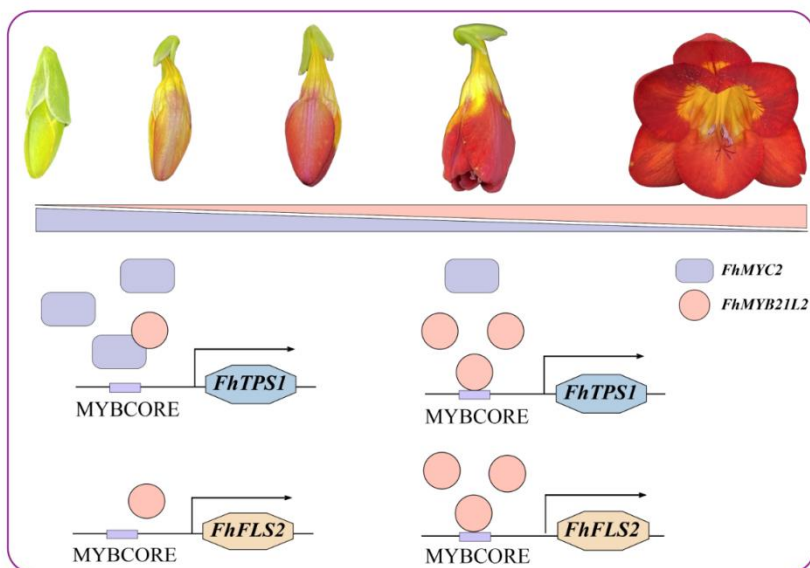


图 7 *FhMYB21L2* 与 *FhMYC2* 协同调控香雪兰 *FhTPS1* 和 *FhFLS2* 模式图

Fig.7 *FhMYB21L2* and *FhMYC2* synergistically regulate *FhTPS1* and *FhFLS2* patterns of *Sycophantasia*

6.展望

通过对不同野生种与园艺种的花色与花香的检测和鉴定,王等^[106]前期利用染色体工程技术培育出5个具有花型大、花色艳、植株高等优良性状的香雪兰新品种。这表明研究花色花香的规律可以更好地指导亲本选配和提高杂交育种的效率,此外在香雪兰中不同种野生种中花香花色成分存在有和无的差异,这暗示可以通过正向遗传学建立杂交群体通过混池测序(BSA seq)定位相关花色花香物质,开发紧密连锁分子标记可用于分子标记辅助选择育种(MAS breeding)。

我国是世界上众多花卉的起源和分布中心,然而大部分花卉品种依赖于进口。用基因编辑等分子育种手段,缩短驯化周期,加快育种进程,是实现我国花卉种业快速发展的有效途径。基因编辑技术育种依赖于重要性状形成机制的解析,而花香、花色是花卉作物重要的观赏性状,其多样性决定了花卉作物的品质和经济价值。研究表明:花卉植物在驯化和进化的历程中,花香和花色经常呈现协同变化的规律,暗示了二者之间可能存在的复杂的内在联系。挥发性萜类物质、花色苷和类胡萝卜素是植物界广泛存在的影响花香、花色形成的最重要的色香物质,要想厘清花香、花色之间的协同变化机制,可以从阐释三类色香物质生物合成的协同调控机制入手。近年来,上述三类物质的合成和调控机制一直是植物分子生物学和观赏园艺领域的研究焦点,然而大部分工作都是单独聚焦个别物质开展,难以解释其控制的花香花色的协同变化机制。因此,需要寻找一种代表性观赏花卉研究并揭示花香花色协同形成的调控机制,为利用基因编辑技术进行花卉作物新品种培育提供靶点。

香雪兰作为单子叶球根草本花卉,目前已建立了组织和细胞水平的瞬时转化体系^[107],且可以进行稳定的遗传转化^[108],使得香雪兰已经具有发展成为球根花卉分子生物学的代表性物种的潜力。此外香雪兰花朵颜色鲜艳、香气宜人,并且花朵颜色与气味随着花朵发育呈现出协同变化。花朵发育早期无色无香,随着花朵发育花朵着色挥发出香味物质,这暗示香雪兰中可能存在着一套或多套系统协同控制花色花香的形成,尽管一些转录因子已被证明可以调节颜色和气味通路基因或酶,但关于它们的真实功能、功能保守性、相互关系以及它们如何对信号通路做出反应仍然存在差距。毫无疑问,花朵内部一定存在一个高度复杂的网络,它整合了所有可以想象的因素,以精细调节颜色合成和气味形成^[109],值得进一步的研究。

参考文献:

- [1] Amrad A, Moser M, Mandel T, de Vries M, Schuurink RC, Freitas L, Kuhlemeier C. Gain and Loss of Floral Scent Production through Changes in Structural Genes during Pollinator-Mediated Speciation. *Current Biology*, 2016, 26 (24): 3303-3312.
 - [2] Chandler S F, Brugliera F. Genetic modification in floriculture. *Biotechnol Lett. Biotechnology Letters*, 2011, 33(2): 207-14.
 - [3] Maleka M F, Albertyn J, Spies J J. The floriculture industry and flower pigmentation. *Philos Trans Genet*, 2013, 2: 55-110.
 - [4] Davies, K M, Schwinn, K E. Molecular Biology and Biotechnology of Flower Pigments. In *Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives*, 2010, 2: 161-187.
 - [5] 黎洁, 李霆格, 王童欣, 王健. 植物花青素和甜菜色素互斥机理研究进展. *植物遗传资源学报*. 2023, 24(6): 1515-1526.
- Li J, Li T G, Wang T X, Wang J. Review of the Mutually Exclusive Mechanism between the Anthocyanins and Betalains Pigments in Plants. *Journal of Plant*

Genetic Resource 2023, 24(6): 1515-1526.

[6] Zhou X W, Fan Z Q, Chen Y, Zhu Y L, Li J Y, Yin H F. Functional analyses of a flavonol synthase-like gene from *Camellia nitidissima* reveal its roles in flavonoid metabolism during floral pigmentation. *Journal of Biosciences*, 2013, 38: 593–604.

[7] Huits H S, Cerats A C, Kreike M M, Genetic control of dihydroflavonol 4-reductase gene expression in *Petunia hybrida*. *The Plant Journal*, 1994, 6(3): 295–310.

[8] Bieza K, Lois R. An *Arabidopsis* mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. *Plant Physiology*, 2001, 126(3): 1105–1115.

[9] Mo Y, Nacel C, Taylor L P. Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 1992, 89(15): 7213–7217.

[10] 范文广, 柴佳靖, 李保豫, 田亚琴, 田辉, 任海伟, 白鹏, 潘香逸. 百合花青苷分子调控研究进展. *植物遗传资源学报* 2023, 24(5): 1236-1247.

Fan W G, Cai J J, Li B Y, Tian Y Q, Tian H, Ren H W, Bai P, Fan X Y. Advances in Molecular Regulation of Anthocyanin Biosynthesis in *Lilium*. *Journal of Plant Genetic Resources*. 2023, 24(5): 1236-1247.

[11] Hichri I, Barrieu F, Bogs J, Kappel C, Delrot S, and Lauvergeat V. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62: 2465–2483.

[12] Jaakola L. New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. *Trends in Plant Science*, 2013, 18: 477–483.

[13] Morita Y, Takagi K, Fukuchi-Mizutani M, Ishiguro K, Tanaka Y, Nitasaka E, Nakayama M, Saito N, Kagami T, Iida S. A chalcone isomerase-like protein enhances flavonoid production and flower pigmentation. *The Plant Journal*, 2014, 78: 294–304.

[14] Mol J, Jenkins G, Schafer E, Weiss D, Walbot V. Signal perception, transduction, and gene expression involved in anthocyanin biosynthesis. *Crit Rev Plant Sci*, 1996, 15: 525–557.

[15] Maier A, Hoecker U. COP1/SPA ubiquitin ligase complexes repress anthocyanin accumulation under low light and high light conditions. *Plant Signal Behav*, 2015, 10(1): e970440.

[16] 杜丹妮, 张超, 高树林, 董丽. 低温对牡丹切花花色和花青素苷合成的影响. *植物遗传资源学报*. 2016, 17(2): 295-302.

Du B N, Zhang C, Gao S L, Dong L. Effect of Low Temperature on Flower Color and Anthocyanin biosynthesis in Tree Peony (*Paeonia suffruticosa*) 'Luoyang Hong' cut Flower. *Journal of Plant Genetic Resources*. 2016, 17(2): 295-302.

[17] Zhang Y, Butelli E, Martin C. Engineering anthocyanin biosynthesis in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2014, 19: 81–90.

[18] Ji X H, Wang Y T, Zhang R, Wu S J, An M M, Li M, Wang C Z, Chen X L, Zhang Y M, Chen X S. Effect of auxin, cytokinin and nitrogen on anthocyanin biosynthesis in callus cultures of red-fleshed apple (*Malus sieversii* f. *niedzwetzkyana*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2015, 120: 325–337.

[19] Lewis D R, Ramirez M V, Miller N D, Vallabhaneni P, Ray K W, Helm R F, Winkel B S, Muday G K. Auxin and ethylene induce flavonol accumulation through distinct transcriptional networks. *Plant Physiol*, 2011, 156(1): 144–164.

[20] Han J, Li T, Wang X, Zhang X, Bai X, Shao H, Wang S, Hu Z, Wu J, Leng P. AtMYB24 Regulates Floral Terpenoid Biosynthesis Induced by Blue Light in Snapdragons. *Frontiers in Plant Science*. 2022 13: 885168.

[21] Jakobsen H B, Olsen C E. Influence of climatic factors on emission of flower volatiles in situ. *Planta* (1994) 192: 365–371.

[22] Brown, N.E. *Freesia Klatt*, and Its History, South African National Biodiversity Institute, 1935, 1: 1–31.

[23] Goldblatt, P. Systematics of *Freesia* (Iridaceae). *J. Southern Africa. Botany*, 1982, 48: 39–92.

[24] Klatt, F. W. *Freesia leichtlinii* F. W. Klatt. *Gartenflora*, 1874, 23: 289–290.

[25] Wongcha-ochant S, Inamoto K, Doi M. Analysis of flower scent of *Freesia* species and cultivars. *Acta Horticulturae*, 2005, 673: 595–601.

[26] Manning J C, Goldblatt P, Duncan G D, Forest F, Kaiser R, Tatarenko I. Botany and horticulture of the genus *Freesia* (Iridaceae). South African National Biodiversity Institute, 2010: 114

[27] Ryndin A V, Kulyan R V, Slepchenko N A. Subtropical and flower crops breeding at the Subtropical Scientific Centre. *Vavilovskii Zhurnal Genet Selektii*, 2021, 25(4): 420–432.

[28] 徐怡倩, 袁媛, 陶秀花, 杨娟, 失益敏, 唐东芹. 小苍兰花瓣主要花色苷组分研究[J]. *植物研究*, 2016, 36(2): 184–189.

Xu Q, Yuan Y, Tao X, Yang J, Shi Y, Tang D. Main anthocyanin profiles in petals of *Freesia hybrida*. *Bulletin of botanical research*, 2016, 36(2): 184–189.

[29] Sun W, Liang L, Meng X Y, Li Y Q, Gao F, Liu X, Wang S C, Gao X, Wang L. Biochemical and molecular characterization of a flavonoid

- 3-O-glycosyltransferase responsible for anthocyanins and flavonols biosynthesis in *Freesia hybrida*. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 410.
- [30] Zhu J, Guo X, Li X, et al. Composition of Flavonoids in the Petals of *Freesia* and Prediction of Four Novel Transcription Factors Involving in *Freesia* Flavonoid Pathway. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 2539–2539.
- [31] Tang D L, Sun Y, Li X, Yan Z, Shi Y M. De novo sequencing of the *Freesia hybrida* petal transcriptome to discover putative anthocyanin biosynthetic genes and develop EST-SSR markers. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2018, 40: 168.
- [32] Gao F, Liu B, Li M, Gao X, Fang Q, Liu C, Ding H, Wang L, Gao X. Identification and characterization of terpene synthase genes accounting for volatile terpene emissions in flowers of *Freesia x hybrida*. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69: 4249–4265.
- [33] 林榕燕, 钟淮钦, 黄敏玲, 罗远华, 林兵. 小苍兰品种花香成分分析[J]. *福建农业学报*, 2016, 31(11): 5.
- Lin R Y, Zhong H Q, Huang M L, Luo Y H, Lin B. Aromatics in Flowers of *Freesia hybrida*. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2016, 31(11): 1216–1220.
- [34] Weng S, Fu X, Gao Y, Liu T, Sun Y, Tang D. Identification and Evaluation of Aromatic Volatile Compounds in 26 Cultivars and 8 Hybrids of *Freesia hybrida*. *Molecules*, 2021, 26(15): 4482.
- [35] Srinivasan A, Ahn M S, Jo G S, Jo J N, Seo K H, Kim W H, Kang Y I, Lee Y R, Choi Y J. Analysis of Relative Scent Intensity, Volatile Compounds and Gene Expression in *Freesia* "Shiny Gold". *Plants*, 2020, 9(11): 1597.
- [36] Petroni K, Tonelli C. Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs. *Plant Science*, 2011, 181: 219–229.
- [37] Pourcel L, Bohorquez-Restrepo A, Irani N G, Grotewold E. Anthocyanin biosynthesis, regulation, and transport: New insights from model species. *Recent Advances in Polyphenol Research*, 2012, 3: 143–160.
- [38] Holton T A, Cornish E C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *The Plant Cell*, 1995, 7: 1071–1083.
- [39] Forkmann G, Martens S. Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, 12: 155–160.
- [40] JNakatsuka A, Izumi Y, Yamagishi M. Spatial and temporal expression of chalcone synthase and dihydroflavonol 4-reductase genes in the Asiatic hybrid lily. *Plant Science*, 2003, 165: 759–767.
- [41] 蒋会兵, 夏丽飞, 田易萍, 戴伟东, 孙云南, 陈林波. 基于转录组测序的紫芽茶树花青素合成相关基因分析. *植物遗传资源学报*. 2018, 19(5): 967–978.
- Jiang H B, Xia L F, Tian Y P, Dai W D, Sun Y N, Chen L B. Transcriptome Analysis of Anthocyanin Synthesis Related Genes in Purple Bud Tea Plant. *Journal of Plant Genetic Resources*. 2018, 19(5): 967–978.
- [42] Martens S, Mithöfer A. Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry*, 2005, 66: 2399–2407.
- [43] Yoshida K, Iwasaka R, Shimada N, Ayabe S-i, Aoki T, Sakuta M. Transcriptional control of the dihydroflavonol 4-reductase multigene family in *Lotus japonicus*. *Journal of Plant Research*, 2010, 123: 801–805.
- [44] Sun W, Meng X, Liang L, Jiang W, Huang Y, He J, Hu H, Almqvist J, Gao X, Wang L. Molecular and Biochemical Analysis of Chalcone Synthase from *Freesia* hybrid in flavonoid biosynthetic pathway. *Public Library of Science ONE*, 2015, 10(3): e0119054.
- [45] Shimada N, Sasaki R, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Aoki T, Ayabe S. A comprehensive analysis of six dihydroflavonol 4-reductases encoded by a gene cluster of the *Lotus japonicus* genome. *Journal Of Experimental Botany*, 2005, 56: 2573–2585.
- [46] Singh K, Kumar S, Yadav S K, Ahuja P S. Characterization of dihydroflavonol 4-reductase cDNA in tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *Plant Biotechnology Reports*, 2009, 3: 95–101.
- [47] Xie D Y, Jackson L A, Cooper J D, Ferreira D, Paiva N L. Molecular and biochemical analysis of two cDNA clones encoding dihydroflavonol-4-reductase from *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 2004, 134: 979–994.
- [48] Fischer T C, Halbwirth H, Meisel B, Stich K, Forkmann G. Molecular cloning, substrate specificity of the functionally expressed dihydroflavonol 4-reductases from *Malus domestica* and *Pyrus communis* cultivars and the consequences for flavonoid metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2003, 412: 223–230.
- [49] Lo Piero AR, Puglisi I, Petrone G. Gene characterization, analysis of expression and in vitro synthesis of dihydroflavonol 4-reductase from *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *Phytochemistry*, 2006, 67(7): 684–95.
- [50] Wang H, Fan W, Li H, Yang J, Huang J, Zhang P. Functional characterization of Dihydroflavonol-4-reductase in anthocyanin biosynthesis of purple sweet potato underlies the direct evidence of anthocyanins function against abiotic stresses. *Public Library of Science ONE*, 2013, 8(11): e78484.
- [51] Cheng H, Li L, Cheng S, Cao F, Xu F, Yuan H, Wu C, Eugene A P. Molecular cloning and characterization of three genes encoding

- dihydroflavonol-4-reductase from Ginkgo biloba in anthocyanin biosynthetic pathway. Public Library of Science ONE, 2013, 8(8): e72017.
- [52] Huang Y, Gou J, Jia Z, Yang L, Sun Y, Xiao X, F Song, K Luo, N Brett. Molecular cloning and characterization of two genes encoding dihydroflavonol-4-reductase from Populus trichocarpa. Public Library of Science ONE, 2012, 7: e30364.
- [53] Li Y, Liu X, Cai X, Shan X, Gao R, Yang S, Han T, Wang S, Wang L, Gao X. Dihydroflavonol 4-Reductase Genes from *Freesia hybrida* Play Important and Partially Overlapping Roles in the Biosynthesis of Flavonoids. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 428.
- [54] Sun W, Meng X, Liang L, Li, Y, Zhou, T, Cai, X, Wang, L, Gao, X. Overexpression of a *Freesia hybrida* flavonoid 3-O-glycosyltransferase gene, Fh3GT1, enhances transcription of key anthocyanin genes and accumulation of anthocyanin and flavonol in transgenic petunia (*Petunia hybrida*). In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 2017, 53(5): 478–488.
- [55] Meng X, Li Y, Zhou T, Sun W, Shan X, Gao X, Wang L. Functional Differentiation of Duplicated Flavonoid 3-O-Glycosyltransferases in the Flavonol and Anthocyanin Biosynthesis of *Freesia hybrida*. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 1330.
- [56] Ju Z, Sun W, Meng X Y, Liang L J, Li Y Q, Zhou T T, Shen H, Gao X, Wang L. Isolation and functional characterization of two 5-O-glucosyltransferases related to anthocyanin biosynthesis from *Freesia hybrida*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2018, 135: 99-110.
- [57] Caballero-Ortega H , Pereda-Miranda R , Abdullaev F I . HPLC quantification of major active components from 11 different saffron (*Crocus sativus* L.) sources. Food Chemistry, 2007, 100(3): 1126-1131.
- [58] Frusciante S , Diretto G , Bruno M , Ferrante B, Pietrella M, Prado-Cabrero A, Rubio-Moraga A, Beyer P, Gomez-Gomez L, Al-Babili S, Giuliano G. Novel carotenoid cleavage dioxygenase catalyzes the first dedicated step in saffron crocin biosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014, 111(33): 12246-12251.
- [59] He S Y, Qian Z Y, Wen N, Tang F T, Xu G L, Zhou C H. Influence of Crocetin on experimental atherosclerosis in hyperlipidemic-diet quails. European Journal of Pharmacology, 2007, 12;554(2-3):191-5.
- [60] Nam K N, Park Y M, Jung H J, Lee J Y, Min B D, Park S U, Jung W S, Cho K H, Park J H, Kang I, Hong J W, Lee E H. Anti-inflammatory effects of crocin and crocetin in rat brain microglial cells. European Journal of Pharmacology, 2010, 648(1-3): 110-6.
- [61] Bie X, Chen Y, Zheng X, Dai H. The role of crocetin in protection following cerebral contusion and in the enhancement of angiogenesis in rats. Fitoterapia, 2011, 82(7): 997-1002.
- [62] Fang Q, Li Y, Liu B, Meng X, Yang Z, Yang S, Bao T, Kimani S, Gao X, Wang L. Cloning and functional characterization of a carotenoid cleavage dioxygenase 2 gene in safranal and crocin biosynthesis from *Freesia hybrida*. Plant Physiology and Biochemistry, 2020, 154: 439-450.
- [63] Ma D, Constabel CP. MYB Repressors as Regulators of Phenylpropanoid Metabolism in Plants. Trends in Plant Science. 2019, 24(3): 275-289.
- [64] Baudry A, Heim M A, Dubreucq B, Caboche M, Weissshaar B, Lepiniec L. TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal, 2004, 39(3): 366-80.
- [65] Gonzalez A, Zhao M, Leavitt J M, Lloyd A M. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings. Plant Journal, 2008, 53(5): 814-27.
- [66] Patra B, Schluttenhofer C, Wu Y, Pattanaik S, Yuan L. Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants. Biochimica et Biophysica Acta, 2013, 1829(11): 1236-47.
- [67] Xu W, Grain D, Bobet S, Le Gourrierc J, Thévenin J, Kelemen Z, Lepiniec L, Dubos C. Complexity and robustness of the flavonoid transcriptional regulatory network revealed by comprehensive analyses of MYB-bHLH-WDR complexes and their targets in *Arabidopsis* seed. New Phytologist, 2014, 202(1): 132-144.
- [68] Jaakola L. New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. Trends in Plant Science, 2013, 18(9): 477-83.
- [69] Xu W, Dubos C, Lepiniec L. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB-bHLH-WDR complexes. Trends in Plant Science, 2015, 20(3): 176-85.
- [70] Li Y, Shan X, Gao R, Yang S, Wang S, Gao X, Wang L. Two IIII Clade-bHLHs from *Freesia hybrida* Play Divergent Roles in Flavonoid Biosynthesis and Trichome Formation when Ectopically Expressed in *Arabidopsis*. Scientific Reports, 2016, 6: 30514.
- [71] Shan X, Li Y, Yang S, Gao R, Zhou L, Bao T, Han T, Wang S, Gao X, Wang L. A functional homologue of *Arabidopsis* TTG1 from *Freesia* interacts with bHLH proteins to regulate anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in both *Freesia hybrida* and *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology and Biochemistry, 2019, 141: 60-72.
- [72] Li Y, Shan X, Tong L, Wei C, Lu K, Li S, Kimani S, Wang S, Wang L, Gao X. The Conserved and Particular Roles of the R2R3-MYB Regulator FhPAP1

from *Freesia hybrida* in Flower Anthocyanin Biosynthesis. *Plant and Cell Physiology*, 2020, 61(7): 1365-1380.

[73] Li Y, Shan X, Gao R, Han T, Zhang J, Wang Y, Kimani S, Wang L, Gao X. MYB repressors and MBW activation complex collaborate to fine-tune flower coloration in *Freesia hybrida*. *Communications Biology*, 2020, 3(1): 396.

[74] Li Y, Shan X, Zhou L, Gao R, Yang S, Wang S, Wang L, Gao X. The R2R3-MYB Factor FhMYB5 From *Freesia hybrida* Contributes to the Regulation of Anthocyanin and Proanthocyanidin Biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 9: 1935.

[75] Kitaoka N, Lu X, Yang B, Peters R J. The application of synthetic biology to elucidation of plant mono-, sesqui-, and diterpenoid metabolism. *Molecular Plant*, 2015, 8(1): 6-16.

[76] Vranov áE, Coman D, Grussem W. Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 2013, 64: 665-700.

[77] Jia Q, Brown R, Köllner T G, Fu J, Chen X, Wong G K, Gershenzon J, Peters R J, Chen F. Origin and early evolution of the plant terpene synthase family. *Source Normalized Impact per Paper PNAS*, 2022, 119(15): e2100361119.

[78] Karunanithi P S, Zerbe P. Terpene Synthases as Metabolic Gatekeepers in the Evolution of Plant Terpenoid Chemical Diversity. *Frontiers in Plant Science*. 2019, 10: 1166.

[79] Degenhardt J, Köllner T G, Gershenzon J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, 2009, 70(15-16): 1621-37.

[80] Falara V, Akhtar T A, Nguyen T T, Spyropoulou E A, Bleeker P M, Schauvinhold I, Matsuba Y, Bonini M E, Schillmiller A L, Last R L, Schuurink R C, Pichersky E. The tomato terpene synthase gene family. *Plant Physiology*, 2011, 157(2): 770-89.

[81] Wurtzel E T, Kutchan T M. Plant metabolism, the diverse chemistry set of the future. *Science*, 2016, 353(6305): 1232-6.

[82] Hayashi K, Horie K, Hiwatashi Y, Kawaide H, Yamaguchi S, Hanada A, Nakashima T, Nakajima M, Mander L N, Yamane H, Hasebe M, Nozaki H. Endogenous diterpenes derived from ent-kaurene, a common gibberellin precursor, regulate protonema differentiation of the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Physiology*, 2010, 153(3): 1085-97.

[83] Chen F, Tholl D, Bohlmann J, Pichersky E. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *Plant Journal*, 2011, 66(1): 212-229.

[84] Kumar S, Kempinski C, Zhuang X, Norris A, Mafu S, Zi J, Bell S A, Nybo S E, Kinison S E, Jiang Z, Goklany S, Linscott K B, Chen X, Jia Q, Brown S D, Bowman J L, Babbitt P C, Peters R J, Chen F, Chappell J. Molecular Diversity of Terpene Synthases in the Liverwort *Marchantia polymorpha*. *The Plant Cell*, 2016, 28(10): 2632-2650.

[85] Yahyaa M, Matsuba Y, Brandt W, Doron-Faigenboim A, Bar E, McClain A, Davidovich-Rikanati R, Lewinsohn E, Pichersky E, Ibdah M. Identification, Functional Characterization, and Evolution of Terpene Synthases from a Basal Dicot. *Plant Physiology*, 2015, 169(3): 1683-97.

[86] Tholl D, Lee S. Terpene Specialized Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Book*. 2011, 9: e0143.

[87] Dornelas M C, Mazzafera P. A genomic approach to characterization of the Citrus terpene synthase gene family. *Genetics and Molecular Biology*, 2007, 30: 832-840.

[88] Külheim C, Padovan A, Hefer C, Krause S T, Köllner T G, Myburg A A, Degenhardt J, Foley W J. The Eucalyptus terpene synthase gene family. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 450.

[89] Martin D M, Aubourg S, Schouwey M B, Daviet L, Schalk M, Toub O, Lund S T, Bohlmann J. Functional annotation, genome organization and phylogeny of the grapevine (*Vitis vinifera*) terpene synthase gene family based on genome assembly, FLcDNA cloning, and enzyme assays. *Bmc Plant Biology*, 2010, 10: 226.

[90] Nieuwenhuizen N J, Green S A, Chen X, Bailleul E J, Matich A J, Wang M Y, Atkinson R G. Functional genomics reveals that a compact terpene synthase gene family can account for terpene volatile production in apple. *Plant Physiology*, 2013, 161(2): 787-804.

[91] Amborella Genome Project. The Amborella genome and the evolution of flowering plants. *Science*, 2013, 342(6165): 1241089.

[92] Bao T, Kimani S, Li Y, Li H, Yang S, Zhang J, Wang Q, Wang Z, Ning G, Wang L, Gao X. Allelic variation of terpene synthases drives terpene diversity in the wild species of the *Freesia* genus. *Plant Physiology*, 2023, 192(3): 2419-2435.

[93] Zvi MMB, Shklarman E, Masci T, Kalev H, Debener T, Shafir S, Ovadis M, Vainstein A. PAP1 transcription factor enhances production of phenylpropanoid and terpenoid scent compounds in rose flowers. *New Phytologist*, 2012, 195(2): 335-345.

[94] Reeves P H, Ellis C M, Ploense S E, Wu M F, Yadav V, Tholl D, Chélat A, Haupt I, Kennerley BJ, Hodgins C, Farmer E E, Nagpal P, Reed J W. A

regulatory network for coordinated flower maturation. PLoS Genet, 2012, 8(2): e1002506.

[95] Hong G J, Xue X Y, Mao Y B, Wang L J, Chen X Y. Arabidopsis MYC2 interacts with DELLA proteins in regulating sesquiterpene synthase gene expression. The Plant Cell, 2012, 24(6): 2635-48.

[96] Ma D, Pu G, Lei C, Ma L, Wang H, Guo Y, Chen J, Du Z, Wang H, Li G, Ye H, Liu B. Isolation and characterization of AaWRKY1, an *Artemisia annua* transcription factor that regulates the amorpha-4,11-diene synthase gene, a key gene of artemisinin biosynthesis. Plant and Cell Physiology, 2009, 50(12): 2146-61.

[97] Nieuwenhuizen N J, Chen X, Wang M Y, Matich A J, Perez R L, Allan A C, Green S A, Atkinson R G. Natural variation in monoterpene synthesis in kiwifruit: transcriptional regulation of terpene synthases by NAC and ETHYLENE-INSENSITIVE3-like transcription factors. Plant Physiology, 2015, 167(4): 1243-58.

[98] Zhou F, Sun T H, Zhao L, Pan X W, Lu S. The bZIP transcription factor HY5 interacts with the promoter of the monoterpene synthase gene QH6 in modulating its rhythmic expression. Frontiers in Plant Science, 2015, 6:304.

[99] Yu Z X, Li J X, Yang C Q, Hu W L, Wang L J, Chen X Y. The jasmonate-responsive AP2/ERF transcription factors AaERF1 and AaERF2 positively regulate artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. Molecular Plant, 2012, 5(2): 353-65.

[100] Shen S L, Yin X R, Zhang B, Xie X L, Jiang Q, Grierson D, Chen K S. CitAP2.10 activation of the terpene synthase CsTPS1 is associated with the synthesis of (+)-valencene in 'Newhall' orange. Journal of Experimental Botany, 2016, 67(14): 4105-15.

[101] Li X, Xu Y, Shen S, Yin X, Klee H, Zhang B, Chen K, Hancock R. Transcription factor CitERF71 activates the terpene synthase gene CitTPS16 involved in the synthesis of E-geraniol in sweet orange fruit. Journal of Experimental Botany, 2017, 68(17): 4929-4938.

[102] Yu Z X, Wang L J, Zhao B, Shan C M, Zhang Y H, Chen D F, Chen X Y. Progressive regulation of sesquiterpene biosynthesis in *Arabidopsis* and *Patchouli* (*Pogostemon cablin*) by the miR156-targeted SPL transcription factors. Molecular Plant, 2015, 8(1): 98-110.

[103] Spyropoulou E A, Haring M A, Schuurink R C. Expression of Terpenoids 1, a glandular trichome-specific transcription factor from tomato that activates the terpene synthase 5 promoter. Plant Molecular Biology, 2014, 84(3): 345-57.

[104] Yang Z, Li Y, Gao F, Jin W, Li S, Kimani S, Yang S, Bao T, Gao X, Wang L. MYB21 interacts with MYC2 to control the expression of terpene synthase genes in flowers of *Freesia hybrida* and *Arabidopsis thaliana*. Journal of Experimental Botany, 2020, 1(14):4140-4158.

[105] Shan X, Li Y, Yang S, Yang Z, Qiu M, Gao R, Han T, Meng X, Xu Z, Wang L, Gao X. The spatio-temporal biosynthesis of floral flavonols is controlled by differential phylogenetic MYB regulators in *Freesia hybrida*. New Phytologist, 2020, 228(6): 1864-1879.

[106] 王丽. 香雪兰的快速繁殖技术. CN, CN1232167 C.

Wang L, Rapid propagation technology of *Freesia hybrida*. CN, CN1232167 C.

[107] Shan X, Li Y, Zhou L, Tong L, Wei C, Qiu L, Gao X, Wang L. Efficient isolation of protoplasts from *freesia* callus and its application in transient expression assays. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2019, 138: 529-541.

[108] Uwagaki Y, Matsuda E, Komaki M, Murahama M, Otani M, Nishizawa N, Hamada T. Agrobacterium-mediated transformation and regeneration of *Freesia hybrida*. Plant Biotechnology, 2015, 32(2): 165-168.

[109] Li Y, Bao T, Zhang J, Li H, Shan X, Yan H, Kimani S, Zhang L, Gao X. The coordinated interaction or regulation between floral pigments and volatile organic compounds. Horticultural Plant Journal, 2024, (24): 2468-0141.