

比利时杜鹃花黄烷酮 3-羟化酶基因克隆及功能分析

蒋宝鑫¹, 吴泽航¹, 杨国霞¹, 吕思佳¹, 贾永红¹, 吴月燕¹, 周若一², 谢晓鸿^{2*}

1 浙江万里学院生物与环境学院, 浙江 宁波 315100

2 浙江万里学院设计艺术与建筑学院, 浙江 宁波 315100

蒋宝鑫, 吴泽航, 杨国霞, 吕思佳, 贾永红, 吴月燕, 周若一, 谢晓鸿. 比利时杜鹃花黄烷酮 3-羟化酶基因克隆及功能分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(2): 653-669.

JIANG Baoxin, WU Zehang, YANG Guoxia, LÜ Sijia, JIA Yonghong, WU Yueyan, ZHOU Ruoyi, XIE Xiaohong. Cloning and functional analysis of flavanone 3-hydroxylase gene in *Rhododendron hybridum* Hort.[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(2): 653-669.

摘 要: 黄烷酮 3-羟化酶(flavanone 3-hydroxylase, F3H)是植物花青素(anthocyanin)合成过程中的关键酶。本研究以红色比利时杜鹃花(*Rhododendron hybridum* Hort.)不同发育时期的花瓣为实验材料, 利用反转录 PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR)和 cDNA 末端快速克隆(rapid-amplification of cDNA ends, RACE)技术对比利时杜鹃花黄烷酮 3-羟化酶(*Rhododendron hybridum* Hort. flavanone 3-hydroxylase, *RhF3H*)基因进行克隆, 并进行生物信息学分析; 利用 qRT-PCR 技术对不同发育时期花瓣 *RhF3H* 基因表达量进行分析; 构建 pET-28a-*RhF3H* 原核表达载体对 *RhF3H* 蛋白进行制备和纯化; 构建 pCAMBIA1302-*RhF3H* 过表达载体, 通过农杆菌介导法进行拟南芥遗传转化研究。结果表明, 比利时杜鹃花 *RhF3H* 基因全长为 1 245 bp, 开放阅读框(open reading frame, ORF)为 1 092 bp, 编码 363 个氨基酸, 含有 Fe²⁺结合基序和 2-酮戊二酸结合基序的双加氧酶超家族。系统进化分析表明, 比利时杜鹃花 *RhF3H* 蛋白与越橘 F3H 蛋白亲缘关系最近; 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)分析表明, 在不同发育时期花瓣中, 红色比利时杜鹃花 *RhF3H* 基因的表达水平呈先上升后下降的趋势, 在初开期表达量最高; 原核表达结果表明, 构建原核表达载体 pET-28a-*RhF3H* 诱导蛋白大小约为 40 kDa, 与理论值相近; 成功获得转基因 *RhF3H* 拟南芥植株, PCR 鉴定和 β -葡萄糖苷酸酶(β -glucuronidase, GUS)染色证明 *RhF3H* 基因整合到拟南芥植株基因组中。qRT-PCR、总黄酮和花青素含量分析显示, 相对于野生型, *RhF3H* 在转基因拟

资助项目: 国家级创新训练项目(202110876042); 浙江省重点研发计划(2021C02053); 宁波市科技创新 2025 现代种业重大专项(2021Z005)

This work was supported by the National Innovative Training Program (202110876042), the Zhejiang Provincial Key Research and Development Program (2021C02053), and the Ningbo Science and Technology Innovation 2025 Modern Seed Industry Major Special Project (2021Z005).

*Corresponding author. E-mail: zwuxxh@zww.edu.cn

Received: 2022-07-26; Accepted: 2022-11-24

南芥植株中显著高表达,其总黄酮和花青素含量也显著增加。本研究为探究杜鹃花 *RhF3H* 基因功能提供一定的理论基础,对杜鹃花花色的分子机理有重要的研究价值。

关键词: 比利时杜鹃花; 黄烷酮 3-羟化酶; 基因克隆; 生物信息学分析; 原核表达; 转基因拟南芥植株

Cloning and functional analysis of flavanone 3-hydroxylase gene in *Rhododendron hybridum* Hort.

JIANG Baixin¹, WU Zehang¹, YANG Guoxia¹, LÜ Sijia¹, JIA Yonghong¹, WU Yueyan¹, ZHOU Ruoyi², XIE Xiaohong^{2*}

1 School of Biology and Environment, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, Zhejiang, China

2 School of Design Art and Architecture, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, Zhejiang, China

Abstract: Flavanone 3-hydroxylase (F3H) is a key enzyme in the synthesis of phycocyanidins. In this experiment, the petals of red *Rhododendron hybridum* Hort. at different developmental stages were used as experimental materials. The *R. hybridum* flavanone 3-hydroxylase (*RhF3H*) gene was cloned using reverse transcription PCR (RT-PCR) and rapid-amplification of cDNA ends (RACE) techniques, and bioinformatics analyses were performed. Petal *RhF3H* gene expression at different developmental stages were analyzed by using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). A pET-28a-*RhF3H* prokaryotic expression vector was constructed for the preparation and purification of RhF3H protein. A pCAMBIA1302-*RhF3H* overexpression vector was constructed for genetic transformation in *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium*-mediated method. The results showed that the *R. hybridum* Hort. *RhF3H* gene is 1 245 bp long, with an open reading frame of 1 092 bp, encoding 363 amino acids. It contains a Fe²⁺ binding motif and a 2-ketoglutarate binding motif of the dioxygenase superfamily. Phylogenetic analysis showed that the *R. hybridum* RhF3H protein is most closely related to the *Vaccinium corymbosum* F3H protein. qRT-PCR analysis showed that the expression level of the red *R. hybridum* *RhF3H* gene tended to increase and then decrease in the petals at different developmental stages, with the highest expression at middle opening stage. The results of the prokaryotic expression showed that the size of the induced protein of the constructed prokaryotic expression vector pET-28a-*RhF3H* was about 40 kDa, which was similar to the theoretical value. Transgenic *RhF3H Arabidopsis thaliana* plants were successfully obtained, and PCR identification and β -glucuronidase (GUS) staining demonstrated that the *RhF3H* gene was integrated into the genome of *A. thaliana* plants. qRT-PCR, total flavonoid and anthocyanin content analysis showed that *RhF3H* was significantly higher expressed in the transgenic *A. thaliana* relative to that of the wild type, and its total flavonoid and anthocyanin content were significantly increased. This study provides a theoretical basis for investigating the function of *RhF3H* gene, as well as for studying the molecular mechanism of flower color in

R. simsii Planch.

Keywords: *Rhododendron hybridum* Hort.; flavanone 3-hydroxylase; genetic cloning; bioinformatics analysis; prokaryotic expression; transgenic *Arabidopsis thaliana* plants

杜鹃花(*Rhododendron simsii* Planch.)是一种常绿落叶灌木,具有很高的观赏价值和巨大的药用价值。在许多观赏植物中,杜鹃花花色是最重要的花卉特征^[1-2]。比利时杜鹃花(*Rhododendron hybridum* Hort.)一年四季花期可以控制,株型优美、花色艳丽、四季常绿和花期长等优点,具有较高的园艺观赏价值和经济价值^[3-4]。比利时杜鹃花是世界盆栽花卉生产的主要种类之一,花色主要以红色和白色为主。

花青素(anthocyanin)为类黄酮化合物,包含多种水溶性天然色素,广泛存于自然界植物的花、叶片和果实等器官中^[5]。花青素作为植物组织着色的重要色素,植物颜色的种类是由花青素的含量和种类决定的^[6]。黄烷酮 3-羟化酶(flavanone 3-hydroxylase, F3H)是花青素合成途径中的关键酶, F3H 蛋白由 Fe²⁺结合(HxDxNH 序列)和 2-酮戊二酸结合(RXS 序列)的双加氧酶超家族(2OG-FeII_oxo superfamily)组成^[7-9]。在金鱼草^[10](*Antirrhinum majus*)中第一次报道黄烷酮 3-羟化酶(F3H)可以将柚皮素转化为二氢山柰酚,生成的二氢黄酮醇可以在不同酶的作用下转化为其他类黄酮物质。之后陆续从石榴(*Punica granatum* L.)^[11]、桑树(*Mulberry*)^[12]、滇水金凤(*Impatiens uliginosa*)^[13]和锦鸡儿(*Caragana korshinskii*)^[14]等植物中分离得到 F3H 基因序列。F3H 基因表达量的高低会影响植物花青素的成分以及在环境胁迫下的生理生化状态。研究表明,在日本牵牛花(*Ipomoea nil*)^[15]中 F3H 突变基因为显性斑点激活因子的等位基因,其序列改变会导致产生淡黄色花朵。在红砂(*Reaumuria soongorica*)^[16]研究中,由于胁迫存

在 F3H 基因表达量增强,导致总黄酮和花青素积累增加,抗氧化能力也随之增强。将枸杞(*Lycium chinense*)^[17] F3H 基因在烟草(*Nicotiana tabacum*)中过表达,与非转基因烟草相比,转基因烟草所含的丙二醛和 H₂O₂ 含量降低,抗氧化能力增强。利用 RNAi 技术构建 F3H 基因载体使草莓(*Fragaria ananassa*)^[18]果体内的 F3H 基因沉默,发现草莓中的花青素含量和黄酮醇含量大大降低。黄丝瓜藓(*Pohlia nutans*) F3H 基因过表达增加了拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中对盐和氧化应激的耐受性^[19]。Forkmann 等^[20]发现大丽菊(*Dahlia pinnata*)、百日草(*Zinnia elegans*)的白花突变体产生是由于 F3H 的转录表达被抑制导致的。Chaipanya 等^[21]利用农杆菌浸润法,将编码发夹式 F3H RNA 的 RNAi 基因沉默载体 pJA8F3H 导入睡莲(*Nymphaea*)花瓣中,与对照组相比,红色和紫蓝色花瓣品种的 F3H 基因表达下调,说明 F3H 基因的表达量与花瓣颜色相关。国内外研究表明,杜鹃花黄烷酮 3-羟化酶 F3H 基因功能尚未报道。

本研究以红色比利时杜鹃花不同发育时期花瓣为实验材料,克隆比利时杜鹃花 *RhF3H* 基因的开放阅读框(open reading frame, ORF)全长,并进行生物信息学分析;对比利时杜鹃花不同时期花瓣 *RhF3H* 基因表达量进行分析;构建原核表达载体 pET-28-*RhF3H*,通过在大肠杆菌 BL21 中异源表达,制备出重组蛋白;利用农杆菌介导法进行拟南芥遗传转化研究。在比利时杜鹃花花色形成中 *RhF3H* 基因的调控机制尚不清楚。本研究为杜鹃花花色形成的分子机理提供一定的理论基础,为杜鹃花花色分子育种提供参考资料。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验材料在我国宁波北仑万景杜鹃良种园中采集。采集后立即置于液氮中,然后放入-80℃超低温冰箱内储存备用。选择生长良好的红色比利时杜鹃花4个生长时期(花苞期、初开期、盛开期和衰亡期)作为实验材料。样品均设3次生物学重复。

LB 肉汤抗性培养基: 50 mg/mL Kan, 50 mg/mL 利福平(rifampicin, Rif), 50 mg/mL 庆大霉素(gentamicin, Gent)。

Solution 培养基: 2.2 g/L 1/2 MS 培养基、50 g/L 蔗糖、0.5 g/L 2-吗啉乙磺酸[2-(4-morpholino)ethanesulfonic acid, MES]、1 μL/mL 6-苄氨基嘌呤(6-benzylaminopurine, 6-BA)和 200 μL/L silwet L-77 表面活性剂,用 1 mol/L NaOH 调 pH 5.7。

1.2 实验方法

1.2.1 RNA 提取和 cDNA 合成

用液氮研磨红色比利时杜鹃花花瓣,使用

RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取花瓣总 RNA。

通过 1.5%琼脂糖凝胶电泳和 SpectraMax 190 全波长酶标仪(北京龙跃生物科技发展有限公司)测定总 RNA 的质量和浓度。按照 NovoScript® Plus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix (gDNA Purge)反转录试剂盒(上海近岸科技有限公司)逆转录合成 cDNA。使用 SMARTer® RACE 5'/3' Kit RACE 试剂盒(宝日医生物技术有限公司)逆转录合成 3'/5' cDNA^[22]。

1.2.2 RhF3H 基因克隆

从 NCBI 数据库中下载与杜鹃花属植物亲缘关系较近浙江红山茶(*Camellia chekiangoleosa*, JN944581.1)、三七(*Panax notoginseng*, MN520446.1)和中华猕猴桃(*Actinidia chinensis*, ACL54955.1)植物的 *F3H* 基因部分编码序列(coding sequence, CDS)序列。使用 Primer 6.0 软件设计简并引物 *F3H*-R1 和 *F3H*-F1 (表 1)。以比利时杜鹃花花瓣 cDNA 为模板,按照 2×Fast *Pfu* Master Mix 酶(上海近岸科技有限公司)说明书进行 PCR 扩增。

表 1 本研究所用的引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

Primer name	Use	Primer sequence (5'→3')
<i>F3H</i> -R1	Conservative zone augmentation	CTTTGAACCTCCCATTGCTTA
<i>F3H</i> -F1		AAGAAAGGTGGATTTCATCGT
<i>F3H</i> -3'	RACE 3' augmentation	TCGTGTCCAGTCATCTTCAGGGGG
<i>F3H</i> -5'	RACE 5' augmentation	CTGGCCTGTAAGTTGCTGGGGG
<i>F3H</i> -R2	Cloning the full-length of ORF	ATGGCGCCAACGACCACCACGCT
<i>F3H</i> -F2		CTAAGCAAAAATCTCTTCAACTC
<i>F3H</i> -R3	Real-time fluorescence quantitative	GCCTGTAAGTTGCTGGGGGTTTT
<i>F3H</i> -F3	PCR	GGGTTGTGGGCATTTTCGGGTAGA
<i>Action</i> -R	Internal reference genes <i>Action</i>	CTCTTCAGGAGCAACACGGA
<i>Action</i> -F		CACTGGTGTTCATGGTTGGGA
<i>F3H</i> -R4	Recombinant protein preparation	<u>AGCTTGTGCGAGGAGCTCGAA</u> AGCAAAAATCTCTTCAACTC
<i>F3H</i> -F4	primer	<u>AAATGGGTCGCGGATCCGAA</u> ATGGCGCCAACGACCACCAC
<i>F3H</i> -R5	Overexpression primer	<u>CCTTTACTAGTCAGATCTACAGCAAAAATCTCTTCAACTC</u>
<i>F3H</i> -F5		<u>GAACAGGGGGACTCTTGACCAT</u> GGCGCCAACGACCACCAC

F: Forward primer; R: Reversed primer. *F3H*-F4 and *F3H*-F5: Underscore 20 bp for the vector sequence. Bold characters for the starting codon. *F3H*-R4 and *F3H*-R5: Underscore 20 bp for the vector sequence.

扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 回收与目的片段大小相同的 PCR 产物, 将回收产物与 pEASY[®]-Blunt Cloning Kit (北京全式金生物技术股份有限公司) 载体连接并转化到大肠杆菌 DH5 α 菌株中。将 DH5 α 感受态细胞均匀涂布具有卡那霉素(kanamycin, Kan)抗性的 LB (Luria-Bertani) 琼脂培养基上, 将平板置于 37 °C 恒温培养箱中, 倒置过夜培养。挑选 37 °C 过夜培养平板的单一菌落, 利用 M13F 和 M13R 通用引物进行菌液 PCR, 筛选阳性克隆菌, 进行序列测定(北京擎科生物科技有限公司)。根据简并引物的扩增序列设计 RACE 引物 *F3H-5'* 和 *F3H-3'* (表 1)。按照 2 \times Fast *Pfu* Master Mix 酶说明书进行 PCR 扩增。后续实验过程与保守区域克隆相同, 使用 DNAMAN 8 软件进行序列拼接获得目的基因全长序列。使用 Primer 6.0 软件设计全长引物 *F3H-R2* 和 *F3H-F2* (表 1), 在起始密码子前和终止密码子后设计引物, 获得 *F3H* 基因全部核苷酸序列^[23]。

1.2.3 *RhF3H* 基因生物信息学分析

采用 DNAMAN 8.0 软件进行同源蛋白质序列比对; 采用 MEGA 6.0 软件构建系统进化树; 采用 ProtParam 网站对 *RhF3H* 蛋白质理化特性进行分析(<http://web.expasy.org/protparam>); 采用 ProtScale 网站对 *RhF3H* 蛋白进行疏水性分析(<http://web.expasy.org/protscale>); 采用 NetPhos 网站对 *RhF3H* 蛋白磷酸化位点进行分析(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>); 采用 SOPMA 和 Swiss Model 网站对 *RhF3H* 蛋白质二级和三级结构进行预测(<https://npsa-prabi.ibcp.fr/>; <https://www.swissmodel.expasy.org/>)。

1.2.4 *RhF3H* 基因实时荧光定量 PCR

选择红色比利时杜鹃花花苞期、初开期、盛开期和衰亡期作为实验材料, 参考刘小飞等^[24] 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase

chain reaction, qRT-PCR) 内参基因筛选及验证的方法, 以 *Action-R* 和 *Action-F* 作为内参引物 (表 1)。设计 qRT-PCR 引物 *F3H-R3* 和 *F3H-F3* (表 1)。提取实验材料总 RNA, 反转录合成荧光 cDNA。参考 NovoStart[®] SYBR qPCR SuperMix Plus (上海近岸科技有限公司) 说明书, 反应体系包括 35 μ L 的 2 \times NovoStart[®] SYBR qPCR SuperMix Plus 酶, 正、反向引物各 1.4 μ L, 1.4 μ L 的 cDNA 模板, 30.8 μ L 的 ddH₂O, 总体积 70 μ L, 进行 qRT-PCR 扩增。反应程序: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 95 °C 20 s, 60 °C 1 min, 30 个循环。采用 2^{- $\Delta\Delta C_T$} 法计算基因相对表达量^[25]。每个样品设置 3 次生物学重复。

1.2.5 *RhF3H* 基因的原核表达

使用 Primer 6.0 软件设计带有酶切位点的上下游引物 *F3H-F4* 和 *F3H-R4*, 下划线 20 bp 为载体序列 (表 1)。按照 2 \times Fast *Pfu* Master Mix 酶说明书进行 PCR 扩增, 后续实验过程与保守区域克隆相同。用 *EcoR* I-HF 酶(纽英伦生物技术有限公司)将 pET-28a 质粒(武汉淼灵生物技术有限公司)进行单酶切, 将酶切产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并进行割胶回收纯化。使用 NovoRec[®] plus One step PCR Cloning Kit (上海近岸科技有限公司) 连接酶试剂盒将纯化产物按载体片段和插入片段摩尔比 1:2 连接。将连接后的 pET-28a-*RhF3H* 载体加入 DH5 α 感受态细胞中, 将一定量的菌体均匀涂布在含 Kan 的抗生素平板上, 37 °C 倒置培养过夜。挑取重组的单一菌落进行菌液 PCR 鉴定, 将质粒送样测序。

1.2.6 *RhF3H* 重组蛋白制备与纯化

将重组质粒 pET-28a-*RhF3H* 和空载质粒 pET-28a, 轻轻混匀加入 BL21 感受态细胞中。将转化后的 BL21 加到含 Kan 抗性的 LB 琼脂培养基, 37 °C 倒置过夜培养。将重组质粒 pET-28a-*RhF3H* 和空载质粒 pET-28a 阳性 BL21

单一菌落培养于 10 mL 含有 Kan 抗性的 LB 肉汤培养基中, 37 °C、200 r/min 培养过夜。当菌液 OD_{600} 达到 0.5–0.8 时, 加入 238 μ L 0.5 mmol/L 的 IPTG 溶液, 在 37 °C 条件下诱导重组蛋白 8 h。诱导结束后 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min 收菌, 用 2 mL 0.1% 磷酸盐缓冲液(PBS)悬浮沉淀, 对沉淀进行超声处理, 4 °C、13 000 r/min 离心 10 min 后吸取上清液, 用 2 mL 0.1% PBS 悬浮沉淀。分别收集上清和沉淀, 取 20 μ L 蛋白样品加入 20 μ L DTT 混匀, 100 °C 水浴加热 5–10 min 使蛋白变性。分别进行 10% SDS-PAGE 电泳和重组蛋白可溶性验证。使用 His60 镍超流树脂和重力柱对可溶性重组蛋白进行纯化, 收集洗脱液, 将洗脱液进行 10% SDS-PAGE 电泳分析^[26]。

1.2.7 pCAMBIA1302-*RhF3H* 过表达载体的构建与农杆菌转化

使用 Primer 6.0 软件设计带酶切位点上、下游引物 *F3H-F5* 和 *F3H-R5*, 下划线 20 bp 为载体序列(表 1)。按照 2×Fast *Pfu* Master Mix 酶说明书进行 PCR 扩增, 后续实验过程与保守区域克隆相同。参照 Yuan 等^[27]的方法, 用 *Nco* I-HF 酶(纽英伦生物技术有限公司)将 pCAMBIA1302 质粒进行单酶切, 酶切产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 将酶切产物进行割胶回收纯化。使用 NovoRec® plus one step PCR Cloning Kit 连接酶试剂盒将纯化产物按载体片段和插入片段摩尔比 1:2 连接。将连接后的 p1302-*RhF3H* 载体加入 DH5 α 感受态细胞中, 将一定量的菌体均匀涂布在含 Kan 的 LB 抗性琼脂培养基上, 37 °C 倒置过夜培养。挑取平板上的单一菌落进行 PCR 鉴定, 将质粒送样测序。将 p1302-*RhF3H* 重组质粒和 p1302 空载质粒利用冻融法转化到农杆菌 GV3101 中, 将一定量的菌体均匀涂布在含卡那霉素的 LB 抗性琼脂培养基上, 28 °C 倒置过夜

培养。挑取重组的单一菌落进行 PCR 鉴定。

1.2.8 拟南芥植株遗传转化、纯合体筛选及 GUS 染色

挑取农杆菌平板上重组质粒 p1302-*RhF3H* 和空质粒 p1302 的单一菌落, 与 5 mL LB 肉汤抗性培养基混合, 在 28 °C、200 r/min 的摇床中培养 12 h, 菌液呈橘黄色且无白色絮状物。测量菌液 OD_{600} =0.8–1.2, 吸取 2 mL 橘黄色菌液接种于 150 mL 含有 3 种抗生素的 LB 肉汤抗性培养基中, 在 28 °C、200 r/min 摇床中培养 8 h, 菌液呈橘黄色且有白色絮状物。4 °C、4 000 r/min 离心 10 min, 去除上清液, 加入 1 mL Floral Dip Solution 培养基, 吹打混匀。用 Floral Dip Solution 培养基重悬, 倒入烧杯中备用。在烧杯浸染液中, 将生长良好的拟南芥花蕾浸泡 1–2 min, 保鲜膜保湿暗培养 12 h 以上, 然后置于人工气候培养箱培养。待种子成熟后, 收取 T0 代种子^[28–29]。用 25 mg/L Kan 培养基筛选阳性植株 T1 代, 提取 T1 代转基因植株总 DNA, 选取 *F3H-R5* 和 *F3H-F5* 引物对转基因株系进行 PCR 鉴定。利用 25 mg/L Kan 培养基反复筛选阳性植株到 T3 代。将 T3 代转基因拟南芥植株生长 1 周后, 当幼苗长至 4 片左右时, 对转基因植株进行 β -葡萄糖苷酸酶(β -glucuronidase, GUS)染色, 在体视显微镜下观察照相。

1.2.9 拟南芥植株 *F3H* 基因 qRT-PCR 检测

提取野生型(WT)、T3 代转空载(p1302)和 T3 代转基因拟南芥植株总 RNA, 反转录合成荧光 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析^[30]。

1.2.10 拟南芥植株总黄酮和花青素含量测定

根据舍莉萍等^[31]测量总黄酮的方法, 取出–80 °C 中保存的 WT、T3 代 p1302 和 T3 代转基因拟南芥植株, 精确称取 0.2 g 后, 用液氮磨碎, 置于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 75%乙

醇, 45 °C 条件下恒温超声 1 h, 放入离心机 6 000 r/min 离心 10 min, 待测; 称取芦丁(上海源叶生物科技有限公司)标准品 0.5 g, 用 75% 乙醇溶液定容(25 mL 容量瓶), 即得浓度为 2 mg/mL。依次吸取标准品溶液 0、1、2、3、4、5、6、7 mL 置于 15 mL 离心管中, 用 5% 乙醇溶液定容 12.5 mL 容量瓶, 分别配置成浓度为 0、0.16、0.32、0.48、0.64、0.80、0.96、1.12 mg/mL。取标准液 1.0 mL 置于 15 mL 离心管中, 加入 500 μ L 5% NaNO_2 溶液, 摇匀静置 5 min; 加入 500 μ L 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液, 摇匀静置 6 min; 再加入 500 μ L 40% NaOH 溶液, 用 75% 乙醇溶液定容至 12.5 mL 容量瓶中, 摇匀放置 15 min。以 75% 乙醇为空白对照, 用 SpectraMax 190 酶标仪, 在 510 nm 处测定芦丁含量。根据标准曲线 $y=0.102x-0.001$ ($R^2=0.990$) 计算总黄酮含量。

根据杨飞芸等^[32]和刘长姣等^[33]测量花青素的方法, 取出-80 °C 中保存的 WT、T3 代 p1302 和 T3 代转基因拟南芥植株, 精确称取 0.2 g 后, 用液氮磨, 加入 5% HCl -80% 甲醇溶液 4 °C 浸泡过夜, 12 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 测 530 nm 处的吸光度值; 称取矢车菊素-3-葡萄糖苷(上海源叶生物科技有限公司)标准品 5 mg, 用 5% HCl -80% 甲醇溶液定容

100 mL 容量瓶, 即得浓度为 0.05 mg/mL。依次吸取标准品溶液 0、0.5、1、2、4、5 mL 置于 10 mL 容量瓶中, 用 5% HCl -80% 甲醇溶液定容 10 mL 容量瓶, 分别配置成浓度为 0、0.025、0.05、0.10、0.20、0.25 mg/mL。以 5% HCl -80% 甲醇为空白对照, 用 SpectraMax 190 酶标仪, 在 530 nm 处测定花青素含量。据标准曲线 $y=0.97x+0.003$ ($R^2=0.994$) 计算花青素含量。

1.3 系统分析

4 个发育时期花瓣中 *RhF3H* 基因表达量、转基因拟南芥植株 *F3H* 基因表达量、总黄酮含量和花青素含量实验重复 3 次, 结果用平均值 \pm 标准偏差($x \pm s$)表示。

2 结果与分析

2.1 比利时杜鹃 *RhF3H* 基因的克隆

以比利时杜鹃花 cDNA 为模板, 利用简并引物进行 PCR 扩增获得 490 bp 保守区序列(图 1A); 根据保守区序列进行 RACE 扩增, 分别获得 526 bp 的 5' 序列(图 1B)和 901 bp 的 3' 序列(图 1C)。利用 DNAMAN 软件将保守区、5' 区和 3' 区序列进行比对拼接 *F3H* 基因全长为 1 245 bp, 其中包含 1 092 bp 的完整 ORF 序列(图 1D), 编码 363 个氨基酸, GenBank 登录号为 OP018672。

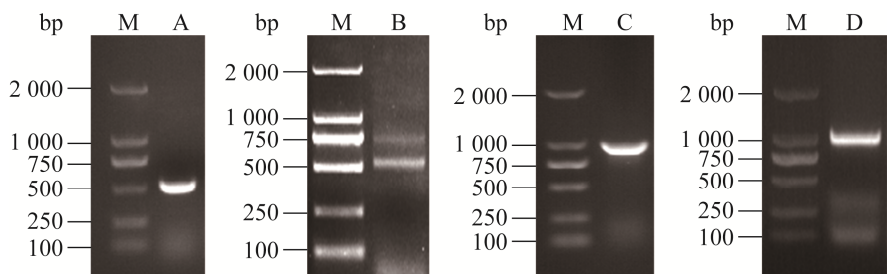


图 1 比利时杜鹃花 *F3H* 基因 PCR 扩增 A: 保守区序列. B: 5' RACE 序列. C: 3' RACE 序列. D: *F3H* 基因的完整 ORF 区域

Figure 1 PCR amplification of *Rhododendron hybridum* Hort. *F3H* gene. A: Conserved region sequence. B: 5' RACE sequence. C: 3' RACE sequence. D: *F3H* gene complete ORF region. M: 2 000 bp DNA marker.

2.2 生物信息学分析

使用 DNAMAN 8 软件将比利时杜鹃花 RhF3H 氨基酸序列与黑茶藨子(*Ribes nigrum*, AVI16674.1, RnF3H)、苦荞麦(*Fagopyrum tataricum*, ACQ99190.1, FtF3H)、西洋梨(*Pyrus communis*, AGL50918.1, PcF3H)、中华猕猴桃(*Actinidia chinensis*, ACL54955.1, AcF3H)、苹果(*Malus domestica*, AAX89397.1, MdF3H)、三枝九叶草(*Epimedium sagittatum*, ABY63660.1, EsF3H)、桑树(*Morus alba*, AOV62761.1, MaF3H)、金花茶(*Camellia nitidissima*, ADZ28514.1, CnF3H)、药葵(*Althaea officinalis*, UOI87842.1, AoF3H)、越橘(*Vaccinium corymbosum*, AYC35389.1, VcF3H)、钟冠报春苣苔(*Primulina swinglei*, AYD87888.1, PsF3H) 和斑地锦草(*Euphorbia maculate*, UNO85900.1, EmF3H)的 F3H 氨基酸序列进行比对(图 2)。其中 RhF3H 蛋白含有 5 个保守基

序, 其中基序 4 和基序 5 中的 His219、Asp221 和 His277 参与 Fe²⁺的结合; 基序 5 中的 Arg287 和 Ser289 参与 2-酮戊二酸的结合; 基序 2 和基序 3 中存在 3 种保守的脯氨酸(Pro149、Pro205 和 Pro208), 在 F3H 蛋白质的折叠过程中起重要作用。RhF3H 蛋白具有 Fe²⁺结合(HxDxnH 序列)和 2-酮戊二酸结合(RXS 序列)的双加氧酶超家族(2OG-FeII_oxo superfamily)。通过 RhF3H 氨基酸序列与其他物种的氨基酸序列进行比对可知, RhF3H 氨基酸保守基序与其他物种相类似。

使用 MEGA 6.0 软件将比利时杜鹃花 RhF3H 氨基酸与黑茶藨子(*Ribes nigrum*, AVI16674.1, RnF3H)、苦荞麦(*Fagopyrum tataricum*, ACQ99190.1, FtF3H)、西洋梨(*Pyrus communis*, AGL50918.1, PcF3H)、中华猕猴桃(*Actinidia chinensis*, ACL54955.1, AcF3H)、苹果(*Malus domestica*, AAX89397.1, MdF3H)、三枝九叶草(*Epimedium*

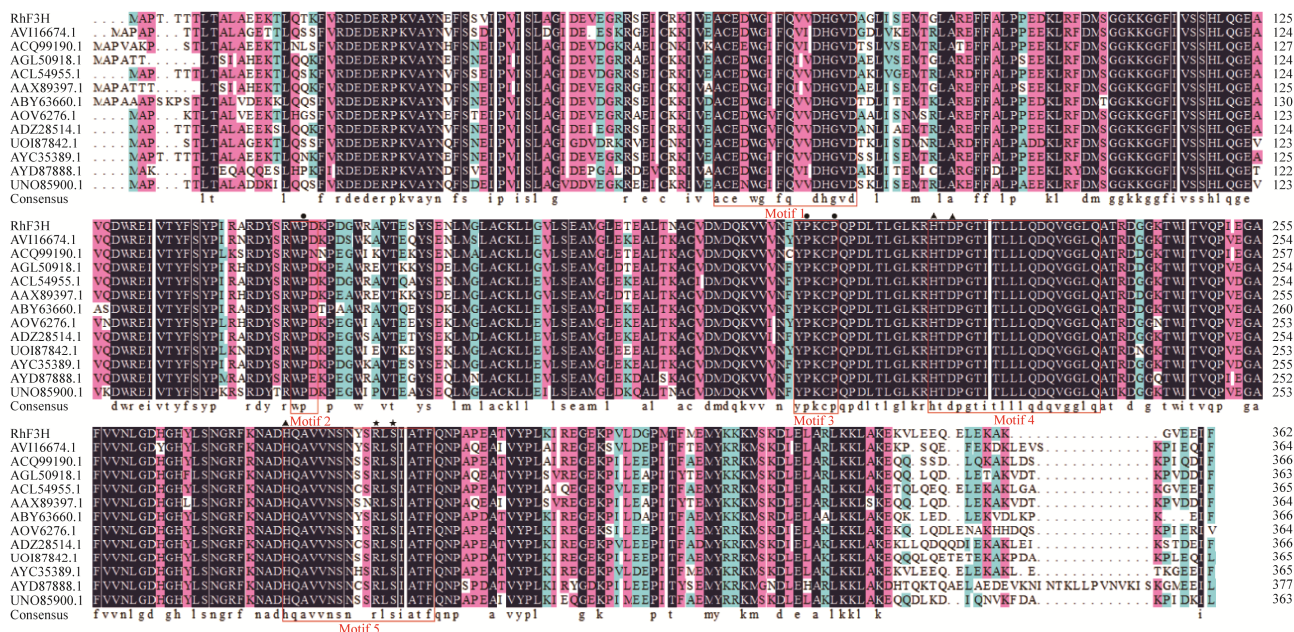


图 2 比利时杜鹃花与其他植物 F3H 氨基酸序列的多重比较

Figure 2 Multiple comparison of amino acid sequences of *Rhododendron hybridum* Hort. with F3H of other plants. Motif 1-5: The 5 conserved motifs of the F3H protein are marked with red lines. ●: Indicates three important proline in the sequence. ▲: Indicates conserved amino acid residues involved in Fe²⁺ binding. ★: Indicates conserved amino acid residues involved in the binding of 2-ketoglutaric acid

sagittatum, ABY63660.1, EsF3H)、桑树(*Morus alba*, AOV62761.1, MaF3H)、金花茶(*Camellia nitidissima*, ADZ28514.1, CnF3H)、药葵(*Althaea officinalis*, UOI87842.1, AoF3H)、越橘(*Vaccinium corymbosum*, AYC35389.1, VcF3H)、钟冠报春苣苔(*Primulina swinglei*, AYD87888.1, PsF3H)和斑地锦草(*Euphorbia maculate*, UNO85900.1, EmF3H) 12 种植物 F3H 氨基酸序列构建进化树(图 3)。结果表明, 比利时杜鹃花 RhF3H 蛋白与越橘 F3H 蛋白亲缘关系最近。

ProtParam 分析表明, RhF3H 蛋白分子式为 $C_{1803}H_{2849}N_{483}O_{547}S_{15}$ 、相对分子质量为 40 525.26 Da、理论等电点为 5.24、总的负电荷残基(Asp+Glu)为 55、总的正电荷残基(Arg+Lys)为 44、不稳定指数(II)为 42.08 和脂肪系数为 83.53。比利时杜鹃 RhF3H 蛋白为不稳定带负电荷的酸性蛋白质。

Protscale 对 RhF3H 进行蛋白疏水性分析(图 4)。RhF3H 蛋白质存在明显的疏水区和亲水区, 其中第 44 位最高, 为 2.278; 第 147 位最低, 为 -2.722。结果表明, RhF3H 蛋白质为

亲水性蛋白质。

利用 NetPhos 3.0 推测比利时杜鹃花 RhF3H 蛋白质磷酸化位点, 结果见图 5。存在 22 个磷酸化位点, 其中丝氨酸(serine, Ser) 9 个, 苏氨酸(threonine, Thr) 8 个, 酪氨酸(tyrosine, Tyr) 5 个。

利用 SOPMA 预测 RhF3H 蛋白的二级结构(图 6A), 有 146 个氨基酸参与形成 α -螺旋, 占总氨基酸的 40.22%; 有 68 个氨基酸参与形成延伸链, 占总氨基酸的 18.73%; 有 19 个氨基酸参与 β -转角, 占总氨基酸的 5.32%; 有 130 个氨基酸参与形成无规则卷曲, 占总氨基酸的 35.81%。结果表明, 比利时杜鹃花 F3H 蛋白主要由无规则卷曲、 α -螺旋和延伸链结构组成。采用 Swiss Model 预测 RhF3H 蛋白的三级结构(图 6B), 在蛋白质数据库中选择与 F3H 蛋白质序列一致性最高的蛋白质为模板进行同源模建, 得到杜鹃 F3H 蛋白质的结构模型。结果表明, 比利时杜鹃花 F3H 蛋白质三级结构与二级结构预测结果相符, 由无规则卷曲、 α -螺旋和延伸链结构组成。

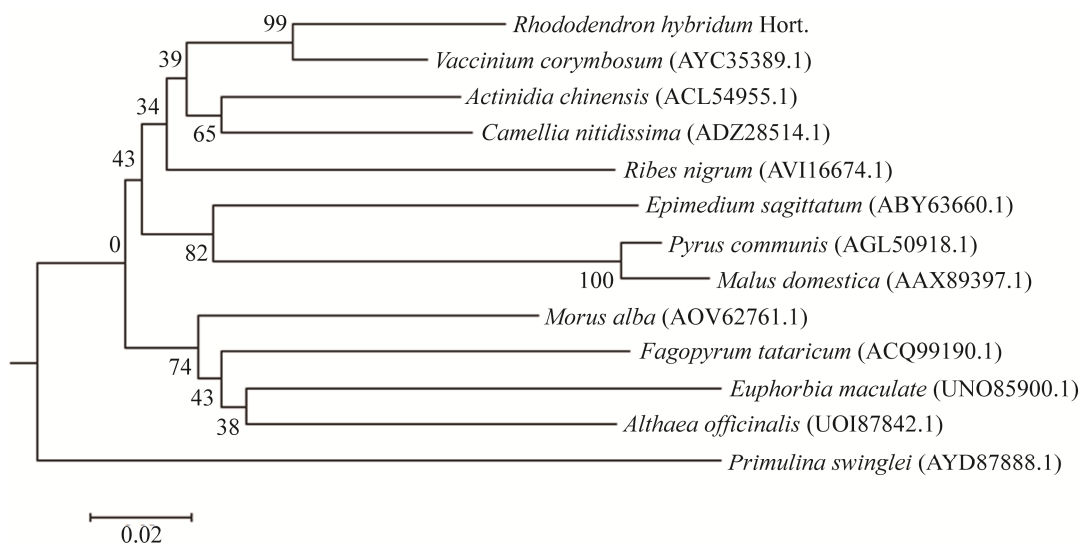


图 3 比利时杜鹃花和其他物种 F3H 蛋白质的系统进化树

Figure 3 Phylogenetic tree of F3H of *Rhododendron hybridum* Hort. and other species.

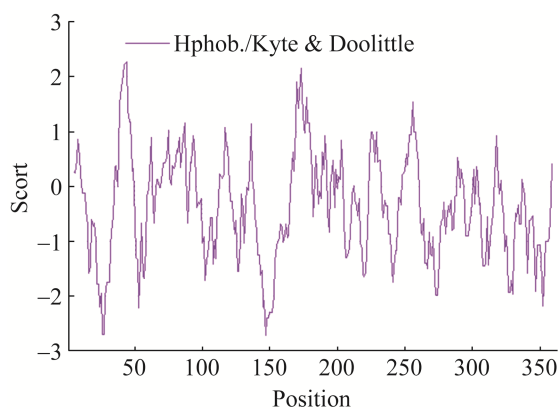


图4 比利时杜鹃花 F3H 蛋白质疏水性/亲水性预测
Figure 4 Prediction of the hydrophobic/hydrophilic of F3H protein in *Rhododendron hybridum* Hort.

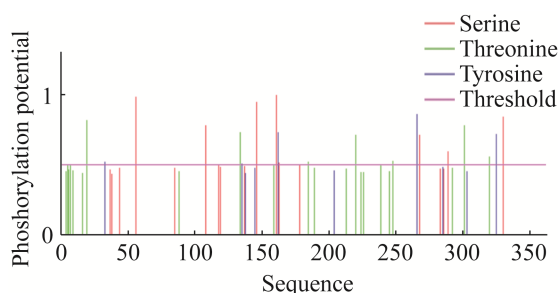


图5 比利时杜鹃花 F3H 蛋白质氨基酸翻译后磷酸化修饰预测

Figure 5 Prediction of phosphorylation site after amino acid translation of F3H protein in *Rhododendron hybridum* Hort.

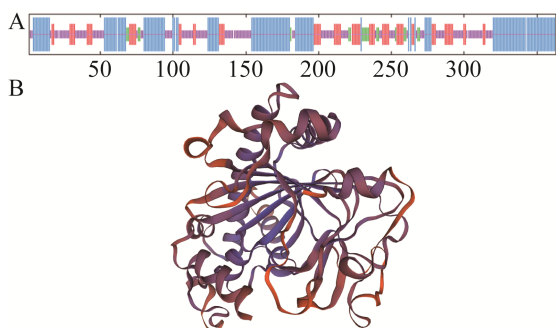


图6 比利时杜鹃花 F3H 蛋白二级和三级结构预测
Figure 6 Prediction of secondary and tertiary structures of *Rhododendron hybridum* Hort. F3H protein. A: Protein secondary structure (blue for alpha helix, red for beta bridge, green for beta turn and purple for random coil). B: Protein tertiary structure.

2.3 *RhF3H* 基因表达分析

如图7所示,在4个花期的花瓣中,*RhF3H* 基因的表达水平呈先上升后下降的趋势,且具有显著差异性($P < 0.05$)。*RhF3H* 基因表达量在初开期最高,其次是盛开期,在花苞期时期表达量最低。花苞期与衰亡期的表达量无显著差异,随着花序的开放,在初开期比花苞期约为6.45倍。这与汪庆昊等^[34]在红比利时杜鹃花花朵发育过程中,花青素的含量呈现先上升后下降的趋势,在盛开期花青素含量最高。与*RhF3H* 基因表达量的变化规律基本符合。

2.4 *RhF3H* 重组蛋白的诱导表达与纯化

如图8A所示,将测序正确的重组质粒 pET-28-*RhF3H* 和空载质粒 pET-28 转入大肠杆菌 BL21 中,以空载质粒 pET-28 转入 BL21 作为蛋白阴性对照。10% SDS-PAGE 凝胶电泳结果显示,可溶性重组蛋白大小约为 40 kDa,与生物信息学预期大小相近。

如图8B所示,使用 His60 镍超流树脂和重力柱对诱导后重组蛋白进行纯化。10% SDS-PAGE

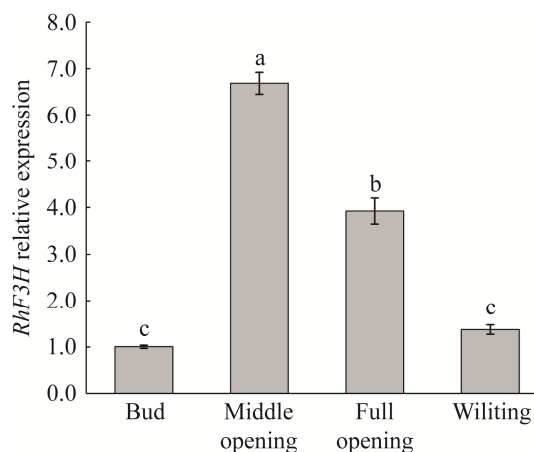


图7 比利时杜鹃花花瓣不同发育阶段 F3H 基因表达量

Figure 7 Expression of F3H genes in *Rhododendron hybridum* Hort. petals at different developmental stage. Different lowercase letters indicate significant differences at 0.05 level.

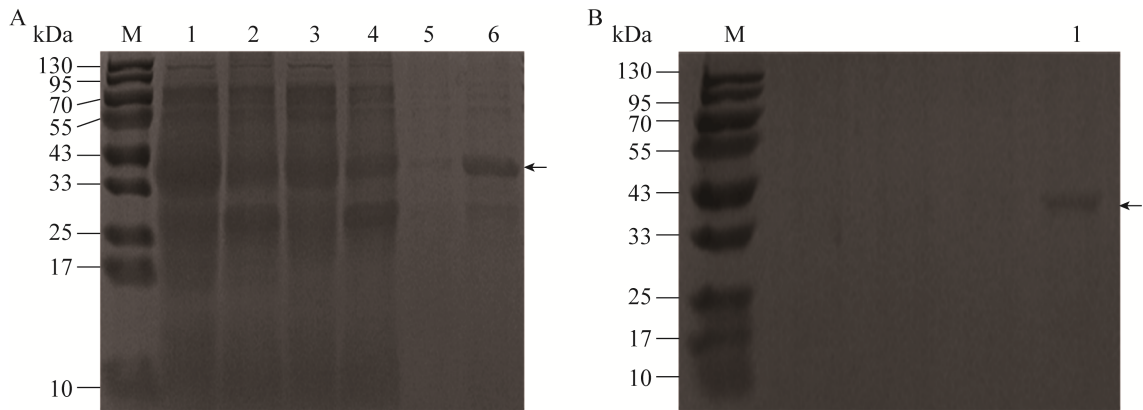


图 8 重组 *RhF3H* 蛋白纯化前后 10% SDS-PAGE 分析

Figure 8 10% SDS-PAGE analysis before and after purification of recombinant *RhF3H* protein. A: 10% SDS-PAGE analysis before purification of recombinant *RhF3H* protein. 1, 3 and 5: Suspension precipitates at 37 °C; 2, 4 and 6: Supernatants at 37 °C. 1–2: Empty plasmids; 3–4: Recombinant plasmids without IPTG; 5–6: Recombinant plasmids with IPTG added. B: 10% SDS-PAGE analysis after purification of recombinant *RhF3H* protein. 1: The purified recombinant protein expressed using plasmid pET-28-*RhF3H*. M: Molecular mass standards (kDa).

凝胶电泳结果显示, 纯化后的 *RhF3H* 蛋白大小约为 40 kDa, 证实了 *RhF3H* 蛋白在 BL21 中成功表达。

2.5 转基因拟南芥筛选鉴定

如图 9 所示, 提取 WT、T3 代 p1302 和 T3 代转基因拟南芥 DNA 进行 PCR 鉴定, 对目的

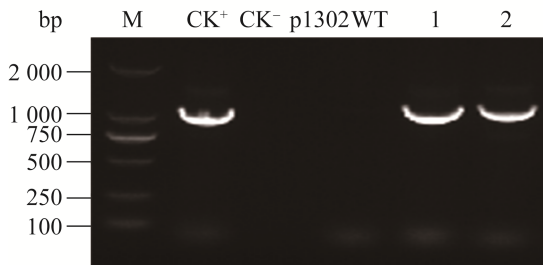


图 9 转基因 *RhF3H* 拟南芥的筛选及纯合株系 DNA 分子鉴定

Figure 9 Screening of transgenic *RhF3H* *Arabidopsis thaliana* and molecular identification of pure strain DNA. M: 2 000 bp DNA marker; CK⁺: Recombinant plasmid as positive control; CK⁻: Sterile water as negative control; p1302: Transgenic null plasmid *Arabidopsis thaliana*; 1–2: p1302-*RhF3H* transgenic *Arabidopsis thaliana*.

基因 *RhF3H* 进行扩增, WT 和 p1302 拟南芥均未扩增出条带, 1、2 和重组质粒(CK⁺)都扩增出条带, 说明 *RhF3H* 基因已整合到拟南芥的基因组 DNA 中。

2.6 转基因拟南芥 GUS 染色

如图 10 所示, p1302-*RhF3H* 基因编码区前的启动子是 CaMV 35S 启动子(增强型); p1302 载体是组成型表达; 基因表达组织定位是整株植物遍在表达。利用 WT、T3 代 p1302 和 T3 代转基因拟南芥植株中 GUS 的表达情况, WT 拟南芥未携带 *GUS* 基因, 整个植株呈无色, p1302 和转基因拟南芥携带 *GUS* 基因, 整个植株呈蓝色。说明目的基因整合到转基因拟南芥基因组中。

2.7 转基因拟南芥 qRT-PCR、总黄酮和花青素含量分析

如图 11A 所示, 野生型(WT)拟南芥植株共种植 20 株, 其中 18 株存活(叶片为绿色), 植株存活率为 90%。T3 代 p1302 拟南芥植株一共种植 15 株, 其中 12 株存活(叶片为绿色), 植株存

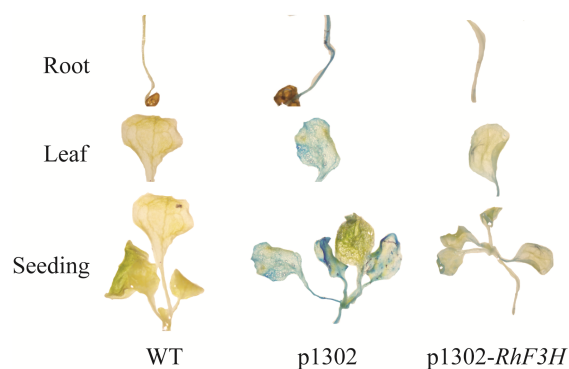


图 10 转基因拟南芥和野生型拟南芥 GUS 染色
Figure 10 GUS staining of transgenic and wild-type *Arabidopsis thaliana*. WT: Wild-type *Arabidopsis thaliana* plants; p1302: Transgenic null-loaded plasmid *Arabidopsis thaliana*; p1302-RhF3H: Transgenic *Arabidopsis thaliana* plants.

活率为 80%。T3 代转基因拟南芥植株共种植 40 株, 其中 39 株存活(叶片为红褐色), 植株存活率为 97.5%。其中 WT 和 p1302 拟南芥叶片颜色呈绿色, 而转基因拟南芥叶片颜色呈红褐色。

如图 11B 所示, WT 和 p1302 转空载拟南芥植物不含 *RhF3H* 基因, T3 代转基因拟南芥植物含 *RhF3H* 基因。从 NCBI 中查找到拟南芥植株 *F3H* 基因(NM_114983.3), 说明拟南芥植株中也含有 *F3H* 基因。DNAMAN 8 软件对比拟南芥 *F3H* 基因和比利时杜鹃花 *RhF3H* 基因具有 72.07% 相似度, 两者荧光定量 PCR 引物相近, 说明选择的荧光定量 PCR 引物不是特异性引物, *AtF3H* 和 *RhF3H* 无法区分, 但不影响

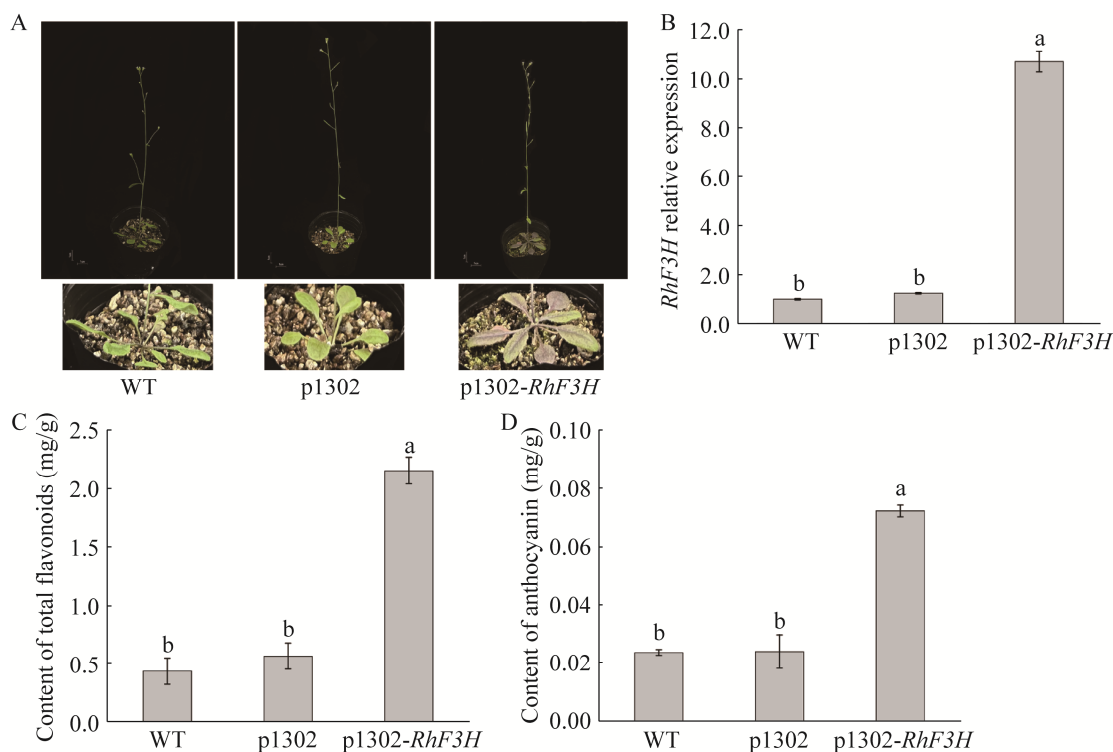


图 11 野生型和转基因拟南芥植株 qRT-PCR、总黄酮和花青素含量分析

Figure 11 qRT-PCR, total flavonoid and anthocyanin content analysis of wild-type and transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. A: Phenotypes of wild-type (WT), transgenic null-loaded plasmid (p1302) and transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. B: qRT-PCR detection of *F3H* gene in WT, p1302 and transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. C: Analysis of total flavonoids in WT, p1302 and transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. D: Analysis of total anthocyanins in WT, p1302 and transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. Different lowercase letters indicate significant differences at 0.05 level.

试验结果。提取 WT、T3 代 p1302 和 T3 代转基因拟南芥总 RNA, 合成荧光 cDNA, 通过 qRT-PCR 分析。结果表明, 在 WT 与 p1302 拟南芥植株中 *AtF3H* 表达量相近, 转基因拟南芥植株中 *RhF3H* 基因表达量高于 WT 和 p1302 拟南芥植株。

如图 11C 所示, 提取 WT、T3 代 p1302 和 T3 代转基因拟南芥植株的总黄酮含量, 采用芦丁标准溶液的校准曲线法检测总黄酮含量。结果表明, 在 WT 和 T3 代 p1302 拟南芥植株总黄酮含量相近。转基因拟南芥植株高于 WT 和 p1302 拟南芥植株总黄酮含量, 比 WT 和 p1302 拟南芥植株总黄酮含量约增加 4.3 倍。

如图 11D 所示, 提取 WT、T3 代 p1302 和 T3 代转基因拟南芥植株的花青素含量, 采用校准曲线法检测花青素含量。结果表明, WT 和 p1302 拟南芥植株花青素含量相近, 转基因拟南芥植株花青素含量较 WT 和 p1302 拟南芥植株花青素含量高, 比 WT 和 p1302 拟南芥植株花青素含量约增加 3.0 倍。

3 讨论与结论

杜鹃花作为重要的观赏性植物, 其花色艳丽具有重要的商业和观赏价值。而杜鹃花花色形成过程中花青素的合成通路相关基因报道较少。为进一步探究其花色形成的生物学特性, 本研究在比利时杜鹃花中克隆得到 1 个 *F3H* 基因, 并在杜鹃花转录组中有一个黄烷酮 3-羟化酶 *RhF3H* 基因^[35-36]。本研究克隆比利时杜鹃花黄烷酮 3-羟化酶(*RhF3H*)基因, 并进行生物信息学分析。结果表明, 比利时杜鹃花 *RhF3H* 基因全长 1 245 bp, 包含 1 092 bp 的完整 ORF 序列, 编码 363 个氨基酸。生物信息学分析表明, 比利时杜鹃 *RhF3H* 蛋白为不稳定带负电荷的酸性蛋白质。*RhF3H* 蛋白由 Fe^{2+} 结合

(HxDxnH 序列)和 2-酮戊二酸结合(RXS 序列)的双加氧酶超家族(2OG-FeII_oxy superfamily)组成。与王海竹等^[7]的预测结果相符, 红穗和白穗醋栗 *RrF3H* 和 *RaF3H* 蛋白结构域由 2-O-酮戊二酸和 Fe^{2+} 依赖的双加氧酶超家族组成, 属于双加氧酶家族; 与许明等^[8]发现的藤茶黄烷酮 3-羟化酶 *AgF3H* 蛋白含有 His217、Asp219 和 His275 参与 Fe^{2+} 的结合(HxDxnH 序列), Arg285 和 Ser287 参与 2-酮戊二酸的结合(RXS 序列)预测结果相符。系统进化树分析表明, 比利时杜鹃花 *RhF3H* 蛋白与越橘 *F3H* 蛋白亲缘关系较最近。

不同发育阶段花瓣 *RhF3H* 基因相对表达量呈先上升后下降的变化趋势, 在初开期的表达量最高, 其次是盛开期。与王蕊等^[37]在华北紫丁香(*Syringa oblata*)中, *SoF3H* 基因表达水平的研究结果基本一致, 随着花序的逐渐开放基因表达量逐渐降低; 与陈丽琦等^[38]威氏绿绒蒿(*Meconopsis wilsonii*) *MwF3H* 基因相对表达量呈现先下降再上升的趋势相同, *MwF3H* 基因相对表达量在花发育不同过程存在明显差异。

构建原核表达载体 pET-28a-*RhF3H*, 在大肠杆菌 BL21 中成功表达重组蛋白, 且表达的重组蛋白在上清液中, *RhF3H* 蛋白属于可溶性蛋白。通过 His60 镍超流树脂和重力柱获得纯化重组蛋白。比利时杜鹃花 *RhF3H* 蛋白大小约为 40 kDa, 与理论值相近。与胡晓婧等^[39]发现茶树(*Camellia sinensis*) *CsF3H* 蛋白诱导表达蛋白大小约为 40 kDa 结果相同; 与赵乐等^[40]在独行菜(*Lepidium apetalum*) *LaF3H* 蛋白大小和经纯化 *LaF3H* 重组蛋白的研究结果相同。本研究为 *RhF3H* 蛋白进行体外酶促反应、酶学活性和底物特异性奠定基础。

构建比利时杜鹃花 p1302-*RhF3H* 过表达载体, 采用花絮侵染法转化拟南芥植株, 并进行

DNA 分子鉴定和 GUS 染色初步检测。野生型 (WT) 和 T3 代转空载(p1302)拟南芥植株无扩增条带, T3 代转基因拟南芥植株带有目的条带。与郑世仲等^[28]将茶树 *CsbHLH* 基因转入拟南芥植株也检测到目的条带, 与本研究结果相同; 转基因拟南芥经 GUS 染色初步检测, WT 拟南芥植株未携带 GUS 基因, 整个植株呈无色。T3 代 p1302 和转基因拟南芥植株携带 GUS 基因, 整个植株呈蓝色。与王立光等^[41]将拟南芥 *AtNHX6* 基因启动子与 GUS 的融合表达载体成功构建并正常启动 GUS 基因表达结果相同。与李兵等^[30]蓝型油菜(*Brassic napus*) *BnPHL12* 基因在转基因阳性植株的根、茎和叶器官中检测到 GUS 染色, 与本研究结果相似。说明比利时杜鹃花 *RhF3H* 基因整合到拟南芥基因组中; 通过 qRT-PCR 分析, 在 WT、p1302 拟南芥植株 *AtF3H* 表达量相近, 转基因拟南芥植株中 *RhF3H* 基因表达量高于 WT 和 p1302 拟南芥植株。杨飞芸等^[32]的研究也发现锦鸡儿 *CiF3H* 转基因拟南芥的表达量也高于对照组。Song 等^[17]将枸杞 *LcF3H* 基因转入烟草中, 与对照组烟草比较, 转基因烟草 *LcF3H* 基因的表达量比野生型中表达量高; 转基因拟南芥总黄酮和花青素含量分析, WT 和 p1302 拟南芥植株总黄酮和花青素含量相近, 转基因拟南芥植株总黄酮和花青素含量较 WT 和 p1302 拟南芥株高。Han 等^[42]在山茶中过表达 *CsF3Ha* 和 *CsF3Hb* 基因拟南芥类黄酮, 转基因拟南芥中大部分黄酮醇苷和低聚原花青素的含量显著增加, 而单儿茶素衍生物的含量降低。以上报道表明, 过表达 *RhF3H* 基因的拟南芥植株影响黄酮和花青素的含量变化, 从而影响拟南芥植株颜色。

本研究首次克隆出比利时杜鹃花 *RhF3H* 基因, 并利用荧光定量法对 *RhF3H* 基因表达量进行分析; 利用原核表达技术获得 RhF3H 纯化蛋

白; 利用过表达技术的拟南芥植株总黄酮和花青素含量都有所增加。为进一步深入研究 *RhF3H* 基因在比利时杜鹃花花青素合成过程中奠定一定的理论基础。

REFERENCES

- [1] ZHU QS, CAO Y, YAO YN, ZHANG YY. The complete chloroplast genome sequence of *Rhododendron oreodoxa* var. *fargesii* (Ericaceae), an ornamental plant[J]. Mitochondrial DNA Part B, 2022, 7(7): 1234-1236.
- [2] de KEYSER E, SHU QY, van BOCKSTAELE E, de RIEK J. Multipoint-likelihood maximization mapping on 4 segregating populations to achieve an integrated framework map for QTL analysis in pot Azalea (*Rhododendron simsii* hybrids)[J]. BMC Molecular Biology, 2010, 11(1): 1-20.
- [3] 李丹丹, 李晓花, 单文, 王兆红, 王凯红, 张乐华. 外源激素对比利时杜鹃扦插根系特征的影响[J]. 生态科学, 2021, 40(2): 82-88.
LI DD, LI XH, SHAN W, WANG ZH, WANG KH, ZHANG LH. Effects of plant exogenous hormones on rooting characteristics of *Rhododendron hybridum*[J]. Ecological Science, 2021, 40(2): 82-88 (in Chinese).
- [4] 何凡, 吴月燕, 谢晓鸿, 杨国霞, 蒋宝鑫, 李东宾, 鄢毅钺, 贾永红. 红比利时杜鹃愈伤悬浮颗粒瞬时转化体系构建及植株再生[J]. 核农学报, 2022, 36(8): 1546-1558.
HE F, WU YY, XIE XH, YANG GX, JIANG BX, LI DB, YAN YC, JIA YH. Construction of transient transformation system of callus suspension particle from *Rhododendron*×*hybridum* hort and plant regeneration[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2022, 36(8): 1546-1558 (in Chinese).
- [5] 王峰, 王秀杰, 赵胜男, 闫家榕, 卜鑫, 张颖, 刘玉凤, 许涛, 齐明芳, 齐红岩, 李天来. 光对园艺植物花青素生物合成的调控作用[J]. 中国农业科学, 2020, 53(23): 4904-4917.
WANG F, WANG XJ, ZHAO SN, YAN JR, BU X, ZHANG Y, LIU YF, XU T, QI MF, QI HY, LI TL. Light regulation of anthocyanin biosynthesis in horticultural crops[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2020, 53(23): 4904-4917 (in Chinese).
- [6] ZHANG G, YANG XH, XU F, WEI D. Combined analysis of the transcriptome and metabolome revealed the mechanism of petal coloration in *Bauhinia*

- variegata*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 939299.
- [7] 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 Horticulturae Sinica*, 2016, 43(10): 2003-2011 (in Chinese).
- [8] 许明, 伊恒杰, 郭佳鑫, 唐进兰, 林世强, 杨志坚, 郑金贵. 藤茶黄烷酮 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, GUO JX, TANG JL, LIN SQ, YANG ZJ, ZHENG JG. Cloning and expression analysis of a flavanone 3-hydroxylase gene from *Ampelopsis grossedentata*[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2020, 40(2): 185-192 (in Chinese).
- [9] 徐雅雯, 陈如意, 张乐, 郭志平, 李嘉诚, 朱群茵. 中华猕猴桃黄烷酮 3-羟化酶基因克隆及其生物信息学分析[J]. *丽水学院学报*, 2022, 44(2): 37-43.
- XU YW, CHEN RY, ZHANG L, GUO ZP, LI JC, ZHU QY. Cloning and bioinformatic analysis of flavanone 3-hydroxylase gene from *Actinidia chinensis*[J]. *Journal of Lishui University*, 2022, 44(2): 37-43 (in Chinese).
- [10] MARTIN C, PRESCOTT A, MACKAY S, BARTLETT J, VRIJLANDT E. Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*[J]. *The Plant Journal*, 1991, 1(1): 37-49.
- [11] KAUR R, ASLAM L, KAPOOR N, MAHAJAN R. Identification and comparative expression analysis of chalcone synthase, flavanone 3-hydroxylase and dihydroflavonol 4-reductase genes in wild pomegranate (*Punica granatum* L.) organs[J]. *Brazilian Journal of Botany*, 2020, 43(4): 883-896.
- [12] DAI MJ, KANG XR, WANG YQ, HUANG S, GUO YY, WANG RF, CHAO N, LIU L. Functional characterization of flavanone 3-hydroxylase (F3H) and its role in anthocyanin and flavonoid biosynthesis in mulberry[J]. *Molecules*, 2022, 27(10): 3341.
- [13] 冯志熙, 刘应丽, 朱佳鹏, 罗超, 黄武略, 李新艺, 蔡斌, 黄海泉, 黄美娟. 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, LUO C, HUANG WL, LI XY, CAI B, HUANG HQ, HUANG MJ. Cloning and expression analysis of *IuF3H* genes in *Impatiens uliginosa*[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19(1): 65-71 (in Chinese).
- [14] 郑晟, 毛玉珊, 张腾国, 聂亭亭. 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, NIE TT. Cloning and expression analysis of *F3H* gene in *Caragana korshinskii*[J]. *Guihaia*, 2017, 37(6): 723-733 (in Chinese).
- [15] HOSHINO A, ABE Y, SAITO N, INAGAKI Y, IIDA S. The gene encoding flavanone 3-hydroxylase is expressed normally in the pale yellow flowers of the Japanese morning glory carrying the speckled mutation which produce neither flavonol nor anthocyanin but accumulate chalcone, aurone and flavanone[J]. *Plant & Cell Physiology*, 1997, 38(8): 970-974.
- [16] LIU ML, LI XR, LIU YB, CAO B. 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 Physiology and Biochemistry*, 2013, 73: 161-167.
- [17] SONG XY, DIAO JJ, JI J, WANG G, GUAN CF, JIN C, WANG YR. Molecular cloning and identification of a flavanone 3-hydroxylase gene from *Lycium chinense*, and its overexpression enhances drought stress in tobacco[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 98: 89-100.
- [18] JIANG F, WANG JY, JIA H, JIA WS, WANG HQ, XIAO M. RNAi-mediated silencing of the flavanone 3-hydroxylase gene and its effect on flavonoid biosynthesis in strawberry fruit[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2013, 32: 182-190.
- [19] LI CC, LIU SH, YAO XH, WANG J, WANG TL, ZHANG ZH, ZHANG PY, CHEN KS. PnF3H, a flavanone 3-hydroxylase from the Antarctic moss *Pohlia nutans*, confers tolerance to salt stress and ABA treatment in transgenic *Arabidopsis*[J]. *Plant Growth Regulation*, 2017, 83: 489-500.
- [20] FORKMANN G, STOTZ G. Selection and characterisation of flavanone 3-hydroxylase mutants of *Dahlia*, *Streptocarpus*, *Verbena* and *Zinnia*[J]. *Planta*, 1984, 161(3): 261-265.
- [21] CHAIPANYA C, SAETIEW K, ARUNYANART S, PARINTHAWONG N. 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 Journal of Science*, 2017, 44(2): 427-437.
- [22] 吕思佳, 吴月燕, 贾永红, 何凡, 蒋宝鑫, 杨国霞,

- 谢晓鸿. 云锦杜鹃苯丙氨酸解氨酶基因的克隆及功能分析[J]. 生物工程学报, 2022, 38(1): 374-385.
- LÜ SJ, WU YY, JIA YH, HE F, JIANG BX, YANG GX, XIE XH. Cloning and functional analysis of the phenylalaninammonio-lyase gene from *Rhododendron fortunei*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(1): 374-385 (in Chinese).
- [23] 王文静, 吕思佳, 何凡, 汪庆昊, 吴月燕. 云锦杜鹃 *RhLIS* 基因的克隆与表达分析[J]. 核农学报, 2021, 35(12): 2724-2732.
- WANG WJ, LYU SJ, HE F, WANG QH, WU YY. Cloning and expression analysis of linalool synthetase gene in *Rhododendron fortunei*[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2021, 35(12): 2724-2732 (in Chinese).
- [24] 刘小飞, 于波, 黄丽丽, 孙映波. 杜鹃红山茶实时定量 PCR 内参基因筛选及验证[J]. 广东农业科学, 2020, 47(12): 203-211.
- LIU XF, YU B, HUANG LL, SUN YB. Screening and validation of reference genes of *Camellia azalea* by quantitative real-time PCR[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2020, 47(12): 203-211 (in Chinese).
- [25] 杨国霞, 蒋宝鑫, 何凡, 吕思佳, 李东宾, 贾永红, 朱平, 谢晓鸿, 吴月燕. 杜鹃花 *TPS* 基因家族鉴定及与萜类物质代谢的关系分析[J]. 生物工程学报, 2022, 38(10): 3740-3756.
- YANG GX, JIANG BX, HE F, LÜ SJ, LI DB, JIA YH, ZHU P, XIE XH, WU YY. Identification of terpene synthase gene family members in *Rhododendron* and its relationship with terpenoid metabolism[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(10): 3740-3756 (in Chinese).
- [26] SI C, DONG W, DA SILVA JD, HE CM, YU ZM, ZHANG MZ, HUANG L, ZHAO CH, ZENG DQ, LI CM, QIU SX, DUAN J. Functional analysis of flavanone 3-hydroxylase (F3H) from *Dendrobium officinale*, which confers abiotic stress tolerance[J]. Horticultural Plant Journal, 2022.
- [27] YUAN SL, DONG Y, ZHANG N, REN YC, YANG MS, GAO B. Construction of high-efficiency transformation vector with multiple insect-resistant genes and expression in tobacco[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2016, 39: 1-7.
- [28] 郑世仲, 蔡烈伟, 刘伟, 刘楚非, 赖钟雄, 林金科. 茶树 *CsbHLH* 基因启动子的克隆与活性[J]. 应用与环境生物学报, 2022, 28(1): 34-39.
- ZHENG SZ, CAI LW, LIU W, LIU CF, LAI ZX, LIN JK. Isolation and functional analysis of the *CsbHLH* promoter from *Camellia sinensis*[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2022, 28(1): 34-39 (in Chinese).
- [29] 史旻, 孙静, 陶俊. 芍药 *PI FLS* 基因生物信息学分析及对拟南芥的遗传转化[J]. 华南农业大学学报, 2018, 39(5): 93-100.
- SHI M, SUN J, TAO J. Bioinformatics analysis of *Paeonia lactiflora* *PI FLS* gene and its genetic transformation in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of South China Agricultural University, 2018, 39(5): 93-100 (in Chinese).
- [30] 李兵, 刘志全, 王璐琳, 胡建军, 唐铭霞, 戴成, 王克秀, 马朝芝. 甘蓝型油菜 *BnPHL12* 基因克隆及功能分析[J]. 西南农业学报, 2022, 35(7): 1477-1490.
- LI B, LIU ZQ, WANG LL, HU JJ, TANG MX, DAI C, WANG KX, MA CZ. Molecular cloning and functional analysis of *BnPHL12* homologous gene in *Brassica napus* L.[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2022, 35(7): 1477-1490 (in Chinese).
- [31] 舍莉萍, 孙菁, 周玉碧, 孙胜男, 赵庆帅, 叶润蓉, 卢学峰, 彭敏. 四种绿绒蒿属植物中总黄酮含量测定[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(3): 466-469.
- SHE LP, SUN J, ZHOU YB, SUN SN, ZHAO QS, YE RR, LU XF, PENG M. Determination of total flavonoids in four *Meconopsis* species from Qinghai-Tibet Plateau[J]. Natural Product Research and Development, 2015, 27(3): 466-469 (in Chinese).
- [32] 杨飞芸, 白洁, 杨天瑞, 王瑞刚. *CiF3H* 基因克隆及功能分析[J]. 东北农业大学学报, 2019, 50(11): 53-60.
- YANG FY, BAI J, YANG TR, WANG RG. Cloning and function analysis of *CiF3H* gene[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2019, 50(11): 53-60 (in Chinese).
- [33] 刘长姣, 郑霞, 熊湘炜, 王磊, 朱珠. 分光光度法测定黑米花青素方法的建立[J]. 粮食与油脂, 2019, 32(1): 73-77.
- LIU CJ, ZHENG X, XIONG XW, WANG L, ZHU Z. Detection of anthocyanin in black rice by spectrophotometry[J]. Cereals & Oils, 2019, 32(1): 73-77 (in Chinese).
- [34] 汪庆昊, 李东宾, 何凡, 王文静, 吴月燕. 杜鹃 *RhFLS* 基因克隆及其功能分析[J]. 分子植物育种, 2022, 20(13): 4243-4250.
- WANG QH, LI DB, HE F, WANG WJ, WU YY. Cloning and functional analysis of *Rh FLS* gene of *Rhododendron*[J]. Molecular Plant Breeding, 2022, 20(13): 4243-4250 (in Chinese).
- [35] YE LJ, MöLLER M, LUO YH, ZOU JY, ZHENG W,

- WANG YH, LIU J, ZHU AD, HU JY, LI DZ, GAO LM. Differential expressions of anthocyanin synthesis genes underlie flower color divergence in a sympatric *Rhododendron sanguineum* complex[J]. BMC Plant Biology, 2021, 21(1): 204.
- [36] ZHOU GL, ZHU P. *De novo* transcriptome sequencing of *Rhododendron molle* and identification of genes involved in the biosynthesis of secondary metabolites[J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1): 1-19.
- [37] 王蕊, 郑健, 李彦慧, 谢玉常. 华北紫丁香黄烷酮 3-羟化酶基因克隆及表达分析[J]. 分子植物育种, 2018, 16(12): 3863-3869.
- WANG R, ZHENG J, LI YH, XIE YC. Cloning and expression analysis of flavanone 3-hydroxylase gene from *Syringa oblata* lindl[J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(12): 3863-3869 (in Chinese).
- [38] 陈丽琦, 严朋飞, 贾维嘉, 区智, 屈燕. 威氏绿绒蒿 (*Meconopsis wilsonii*) 花色相关基因 *MwF3H* 的克隆及表达分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2022, 41(4): 854-861.
- CHEN LQ, YAN PF, JIA WJ, OU Z, QU Y. Cloning and expression analysis of flower color related gene *MwF3H* from *Meconopsis wilsonii*[J]. Genomics and Applied Biology, 2022, 41(4): 854-861 (in Chinese).
- [39] 胡晓婧, 许玉娇, 高丽萍, 夏涛, 王云生. 茶树黄烷酮 3-羟化酶基因(*F3H*)的克隆及功能分析[J]. 农业生物
- 物技术学报, 2014, 22(3): 309-316.
- HU XJ, XU YJ, GAO LP, XIA T, WANG YS. Cloning and functional analysis of flavanone 3-hydroxylase gene (*F3H*) in tea (*Camellia sinensis*)[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2014, 22(3): 309-316 (in Chinese).
- [40] 赵乐, 马利刚, 张金燕, 冯卫生, 匡海学, 郑晓珂. 独行菜 *La F₃H* 基因克隆、序列分析及原核表达[J]. 中草药, 2018, 49(23): 5626-5632.
- ZHAO L, MA LG, ZHANG JY, FENG WS, KUANG HX, ZHENG XK. Cloning, sequence analysis, and prokaryotic expression of *LaF₃H* gene from *Lepidium apetalum*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(23): 5626-5632 (in Chinese).
- [41] 王立光, 陈军, 李静雯. 拟南芥 *AtNHX6* 基因启动子的克隆及表达分析[J]. 西北植物学报, 2019, 39(2): 191-198.
- WANG LG, CHEN J, LI JW. Cloning and expression analysis of *AtNHX6* gene promoter from the *Arabidopsis thaliana*[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2019, 39(2): 191-198 (in Chinese).
- [42] HAN YH, HUANG KY, LIU YJ, JIAO T, MA GL, QIAN YM, WANG PQ, DAI XL, GAO LP, XIA T. Functional analysis of two flavanone-3-hydroxylase genes from *Camellia sinensis*: a critical role in flavonoid accumulation[J]. Genes, 2017, 8(11): 300.

(本文责编 陈宏宇)