

水母雪莲红色细胞系类黄酮含量和相关基因表达

王亚杰, 李厚华, 付婉艺, 高艳, 王冰洁, 李玲

西北农林科技大学林学院, 陕西 杨凌 712100

王亚杰, 李厚华, 付婉艺, 等. 水母雪莲红色细胞系类黄酮含量和相关基因表达分析. 生物工程学报, 2014, 30(8): 1225-1234.

Wang YJ, Li HH, Fu WY, et al. Flavonoids contents and expression analysis of related genes in red cell line of *Saussurea medusa*. Chin J Biotech, 2014, 30(8): 1225-1234.

摘要: 水母雪莲为中国传统名贵中药, 具有散寒除湿、活血通经、抗炎、镇痛等功效, 其主要药用成分为类黄酮化合物。以水母雪莲白色系愈伤组织和经低温、高糖、强光诱导得到的红色系为材料, 比较不同细胞系中类黄酮活性成分、结构基因和转录因子表达的差异。结果表明, 红色系中总黄酮含量为白色系的 3.60 倍; 重要的药用成分为芦丁, 其含量达到干重的 0.25%, 是白色系的 2.40 倍; 红色系中花青苷含量极高, 矢车菊素 3-O-己糖苷和矢车菊素 3-O-琥珀酰己糖苷的含量分别达到干重的 0.12% 和 0.19%; 红色系中 *CHS*、*F3'H*、*FNS*、*FLS*、*DFR* 和 *ANS* 基因的表达均明显高于白色系; 红色系中转录因子 *MYB*、*bHLH* 和 *WD40* 的表达也均明显高于白色系, 其中 *MYB* 的表达量为白色系的 19.70 倍, 说明红色系中转录因子的高水平表达增强了结构基因的表达, 进而提高了类黄酮的合成。红色系中 *bHLH* 和 *WD40* 表达水平相似, 而与 *MYB* 的表达水平相差很大, 推测可能在水母雪莲中 *bHLH* 和 *WD40* 两种转录因子形成二元复合体后, 和 *MYB* 共同调控类黄酮合成途径中结构基因的表达。

关键词: 水母雪莲, 转录因子复合体, 结构基因, 类黄酮生物合成, 表达分析

Received: October 18, 2013; **Accepted:** December 16, 2013

Supported by: National Forestry Public Welfare Industry Research Special (No. 201204308), Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (No. 20120204120006).

Corresponding author: Houhua Li. Tel: +86-15114800050; E-mail: lihouhua73@163.com

国家林业公益性行业科研专项 (No. 201204308), 高等学校博士学科点专项科研基金 (No. 20120204120006) 资助。

网络出版时间: 2014-02-25

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.130536.html>

Flavonoids contents and expression analysis of related genes in red cell line of *Saussurea medusa*

Yajie Wang, Houhua Li, Wanyi Fu, Yan Gao, Bingjie Wang, and Ling Li

College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

Abstract: *Saussurea medusa* is a rare traditional Chinese medicinal herb. Besides anti-inflammatory and analgesic activities, it has effects of disinhibiting cold, dispelling dampness and promoting blood circulation. Flavonoids are the main medicinal compounds in *S. medusa*. Contents of flavonoids and expression of flavonoids biosynthesis related genes in white and red (induced by low temperature, high sucrose and high light) callus were analyzed. The results showed that the total flavone in red line was 3.60 times higher compared to white line. The accumulation of rutin in red line (0.25% of dry weight) was 2.40 times higher compared to white line. Anthocyanins were abundant in red line, with the contents of cyanidin 3-O-glucosidechloride and cyanidin 3-O-succinyl glycoside 0.12% and 0.19% of dry weight respectively. *CHS*, *F3'H*, *FNS*, *FLS*, *DFR* and *ANS* genes were highly expressed in red line compared to white line. Expression of three transcription factors (*MYB*, *bHLH* and *WD40*) in red line was significantly higher than that in white line, especially the expression of *MYB* (19.70 times higher compared to white line). These results indicated that high expression levels of transcription factors induced high expression of structural genes in red line, thereby enhancing the flavonoids biosynthesis. The expression of *bHLH* and *WD40* was similar, whereas it was significantly different from that of *MYB*, indicating that *bHLH* and *WD40* could form a binary complex to regulate expression of structural genes and flavonoids biosynthesis.

Keywords: *Saussurea medusa*, transcription factors complex, structural genes, flavonoids biosynthesis, expression analysis

水母雪莲 *Saussurea medusa* Maxim 是多年生菊科凤毛菊属植物, 自然生长缓慢, 为我国传统名贵中药, 具有散寒除湿、活血通经、抗炎、镇痛等功效^[1]。现代药理研究发现, 水母雪莲中的主要药用活性成分为类黄酮化合物^[2], 水母雪莲提取物具有延缓衰老、抗疲劳抗缺氧、清除自由基、抗早孕、抗辐射及抗肿瘤等作用^[3-4]。其中, 芦丁具有泄热凉血止血、扩张冠状动脉、降低血压^[5]、抗氧化和抗恶性细胞增生^[6]等作用。花青苷是纯天然的抗衰老营养补充剂, 具有保护脑神经系统的作用^[7], 以及美容养颜、降脂减肥、抗衰抗癌、增加视力的功效^[8]。

植物中类黄酮生物合成的起始底物为丙二酰辅酶 A (Malonyl-CoA) 和 4-香豆酰辅酶 A (4-coumaroyl-CoA), 丙二酰辅酶 A 来自乙酰辅

酶 A, 香豆酰辅酶 A 来源于苯丙素代谢途径, 其途径相关的结构基因有 *PAL*、*C4H* 和 *4CL*^[9]。类黄酮生物合成途径的结构基因有 *PAL*、*C4H*、*4CL*、*CHS*、*CHI*、*F3'H*、*F3'5'H*、*FNS*、*FHT*、*FLS*、*DFR* 及 *ANS* 等基因^[10], 这些基因受到相关转录因子的调控 (图 1)。调控类黄酮生物合成途径的转录因子主要分为 3 类: *MYB*、*bHLH* 和 *WD40* 蛋白。一般认为, 3 类转录因子可以形成三元复合体 MBW (*MYB*-*bHLH*-*WD40*), 共同调控植物体内类黄酮的合成^[11-13]。

目前, 水母雪莲野生资源由于受到过度采挖, 已濒临灭绝。近年来, 赵德修等^[14-15]通过对水母雪莲进行细胞组织培养, 获得了水母雪莲的愈伤组织。本研究拟通过测定水母雪莲白色细胞系和经低温、高糖、强光诱导得到的红

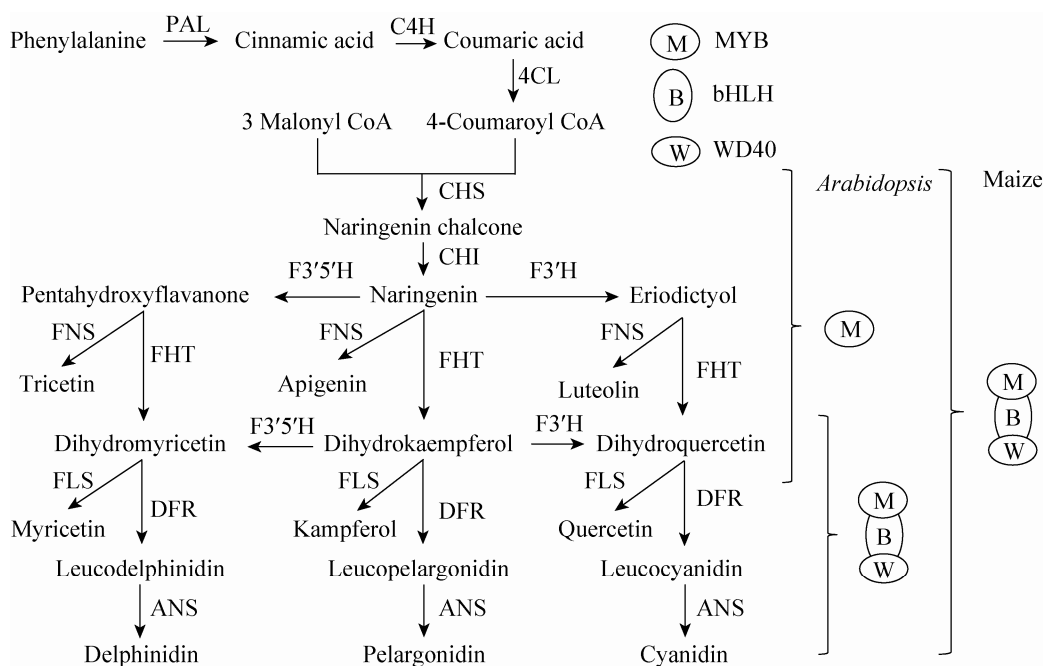


图 1 类黄酮生物合成途径及转录因子调控简图^[11-13]

Fig. 1 Simplified scheme of the flavonoid biosynthesis pathway and transcription factors^[11-13]. MYB (M), bHLH (B) and WD40 (W) transcription factors controll the anthocyanin pathway in *Arabidopsis* and maize and putative MBW complexes are indicated. PAL, phenylalanine ammonia lyase; C4H, cinnamic acid 4-hydroxylase; 4CL, 4-coumarate CoA ligase; CHS, chalcone synthase; CHI, chalcone isomerase; FHT, Flavanone 3 beta-hydroxylase; F3'H, flavanone 3'-hydroxylase; F3'5'H, flavanone 3'5'-hydroxylase; FNS, flavone synthase; DFR, dihydroflavonol reductase; FLS, flavonol synthase; ANS, anthocyanidin synthase.

色细胞系的类黄酮含量，以及类黄酮生物合成相关结构基因和转录因子的表达情况，探讨水母雪莲中类黄酮合成相关转录因子对结构基因以及进一步的对类黄酮生物合成的调控机制，为通过栽培措施或生物技术提高水母雪莲中药用活性成分以及通过细胞培养工厂化生产高保健功能的水母雪莲生药提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

水母雪莲白色细胞系由中国科学院植物研究所赵德修研究员惠赠，保存于 M1 培养基

(MS+2 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA+0.7% 琼脂+3%蔗糖，pH (5.8)^[14]，其培养条件为光强 45–55 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、光周期 16/8 h、温度 (22±1) °C，30 d 继代一次。水母雪莲红色细胞系为本研究组在 M2 培养基 (MS+3.5 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA+0.7% 琼脂+3%蔗糖，pH 5.8) 和光强 90–100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、光周期 16/8 h、温度 (10±1) °C 的条件下诱导得到部分红色愈伤组织基础上，通过多次挑选继代获得，保存于 M1 培养基中。

色谱级标准品芦丁、圣草酚、对香豆酸、儿茶素、矢车菊素、矢车菊素半乳糖苷购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞中总黄酮的含量测定

总黄酮测定采用 AlCl_3 显色法, 以芦丁作为参照品, 芦丁标样在烘箱里 $105\text{ }^\circ\text{C}$ 烘至恒重, 用乙醇溶解成浓度为 1 mg/mL 的标准液。分别取芦丁标准液 0 、 0.2 、 0.4 、 0.6 、 0.8 、 1.0 mL 置入 10 mL 离心管中, 加入 0.2 mL 5% 的 NaNO_2 摇匀后静置 6 min ; 加入 0.2 mL 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, 摇匀后静置 6 min ; 再加入 1 mL 4% NaOH , 摇匀后室温静置 15 min ; 加入 60% 乙醇溶液定容至 10 mL , 于 $450\text{--}540\text{ nm}$ 波长范围内扫描, 确定最大吸收波长 (510 nm)^[16]。测定上述不同浓度标准品反应液在该波长下的光吸收值, 绘制标准曲线。

细胞中总黄酮的含量测定参照李娟等^[16]的方法, 称取真空冷冻干燥 36 h 后的样品, 每 0.1 g 样品加入 5 mL 无水乙醇, 室温下提取 48 h , 其间振荡 $4\text{--}6$ 次, 使提取液充分浸提样品, 每隔 20 min 向样品中加入 5 mL 无水乙醇, 共计 3 次。然后 12 000 r/min 离心 10 分钟, 吸取上清提取液, 加入到带有刻度的离心管中, 用 70% 乙醇定容至 20 mL 。吸取 0.2 mL 提取液, 按照芦丁参照品的方法处理, 于 510 nm 处测定吸光值。根据标准曲线计算细胞中总黄酮含量, 每个样品重复 3 次。

1.2.2 高效液相色谱仪-二极管阵列检测器 (HPLC-DAD) 检测类黄酮和花青苷含量

取培养 12 d 的水母雪莲白色和红色细胞系, 真空冷冻干燥 36 h 后, 称取干燥至恒重的两种雪莲细胞系 0.45 g 各两份, 一份加入 10 mL 甲醇进行提取, 用于检测黄酮类物质, 另一份加入 10 mL 1% 甲醇盐酸进行提取, 用于检测花青苷类物质。于室温下浸提 48 h , 其间振荡 $4\text{--}6$ 次, 使其充分浸提。取上清浸提液, 进行旋转蒸发

浓缩^[17]。

高效液相色谱分析仪器为日立 L-2000 色谱仪, 检测器为日立二极管阵列检测器, 色谱柱型号: Lachrom-C18, $4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$ 色谱柱 (Hitachi, Japan)。流动相参数: A: 0.04% 的甲酸水溶液; B: 色谱级乙腈, 采用梯度洗脱, 洗脱程序为: $0\text{--}40\text{ min}$, A $95\%\text{--}0\%$, B $5\%\text{--}100\%$; $40\text{--}60\text{ min}$, A 0% , B 100% 。柱温 $40\text{ }^\circ\text{C}$, 进样量为 $10\text{ }\mu\text{L}$, 流速 0.5 mL/min , 测定波长为 280 nm 、 535 nm ^[18]。所有样品经 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后上机分析, 每个样品重复 3 次。所测结果与标准品的保留时间和标准曲线进行比对, 确定提取液中类黄酮的种类及其浓度^[18]。

1.2.3 实时定量 PCR 检测相关基因的表达

取培养 12 d 的两种水母雪莲细胞系样品各 0.1 g , 使用 E.Z.N.A Plant RNA Kit (OMEGA, USA) 提取 RNA。取 $1\text{ }\mu\text{g}$ RNA 使用 M-MLV 逆转录酶 (Thermo Fisher, USA) 进行反转录。实时定量 PCR 采用 SYBR Green 法在 IQTM5 多重实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad, USA) 上进行, 以 *Actin* 基因为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行数据分析, 每个样品重复 3 次。所测相关基因引物见表 1。

2 结果与分析

2.1 水母雪莲两种细胞系总黄酮含量

总黄酮含量用比色法测定, 根据结果计算得到芦丁标准品浓度与其吸光度的直线方程: $C=0.5324A-0.0070$, $R^2=0.9999$, 测定波长为 510 nm 。以芦丁的含量进行换算, 得到白色和红色两种细胞系中总黄酮含量。水母雪莲红色系总黄酮含量为 $(25.30\pm 0.163)\text{ mg/g DW}$, 是白色系 $((7.02\pm 0.301)\text{ mg/g DW})$ 的 3.60 倍 (图 2)。

表 1 实时定量 PCR 引物

Table 1 Primers of semi-quantitative interpretation PCR

Primer name	Primer sequence(5'-3')
PALF	GGTGAAGGCGAGTAGTGATTGG
PALR	GCTGAATGTGGAAGGGTGTGA
C4HF	TGACACCAAACCTCGGACCAG
C4HR	ACCAGGCGTTGACCAAGAT
4CLF	GACGAGTGTAGCACAGCAAGT
4CLR	ACGCACATCAGCACATCCT
CHSF	GACACGCTTCGGCTACAGAT
CHSR	AATGGACGCACTATGGAGGAC
CHIF	CATTCCGTCCTCGCCGTTA
CHIR	TGTAGGTCCTTGTGCTTTCC
F3'HF	GGATGACGCCGATGGAGAA
F3'HR	CGATGGGTGGAGCCTGAAG
F3'5'HF	GTTGAATGGGCGATTGCTGAA
F3'5'HR	CCCGATGTAAGGTAGGTTAGGC
FNSF	CTCGGCCCACTCATCCACCA
FNSR	GAGATTCTTKGCTTCATCAGCCTC
FHTF	ACTACCCGAAATGCCCTCAG
FHTR	TCTTGCCACCATCACGAGTC
FLSF	TCTTACAGGGAGATAAATGAGCA
FLSR	CACCAATGTGAATAATGAGAGCA
DFRF	TCCATTCATCACTCCTTCGTTCC
DFRR	TCTTCCTTTGGCTTAGGGTTCTC
ANSF	ACAACGCCCGACGATTACAT
ANSR	CCCGAGAGATAGAACCAGAGAT
MYBF	GCTGTAGGTTGCGATGGTTGA
MYBR	TGCGGTTCTTCTGCTATTCTTC
bHLHF	GCATCAGCAGCGGAGGAC
bHLHR	GGAGTTGGAGGCGGTTAGG
WD40F	CACCGTTGTTGAGATTGGCTTG
WD40R	CGCATTCACTCCCTCTATGTC
ACTINF	GTGACCTTACCGATGGCTTAATGA
ACTINR	CAATTTCCCCTCTGCTGTAGTA

Note: all primers were designed based on the Unigene sequences in *S. involucrata*, except for *FNS* primers which were from GenBank: KF170286.1.

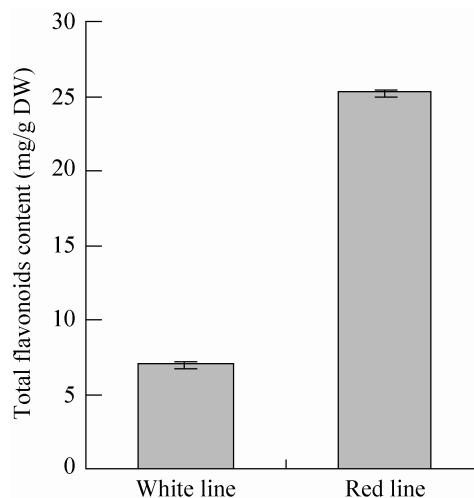


图 2 水母雪莲总黄酮含量分析

Fig. 2 Total flavonoids contents of *S. medusa*.

2.2 水母雪莲两种细胞系主要活性成分含量

在水母雪莲两种细胞系中均检测出儿茶素、芦丁、对香豆酸和圣草酚等类黄酮化合物(图 3), 细胞系间各种组分存在明显差异, 总体上, 红色系中各种类黄酮成分含量明显高于白色系, 尤其是重要的药用成分芦丁, 其含量为 $(2.526 0 \pm 0.273 0)$ mg/g DW, 达到 0.25%, 是白色系的 2.40 倍; 红色系中的儿茶素和圣草酚含量尤其突出, 分别达到 $(5.897 6 \pm 0.192 0)$ mg/g DW 和 $(0.042 7 \pm 0.009 1)$ mg/g DW, 分别为白色系的 6.92 倍和 14.23 倍; 红色系中对香豆酸的含量为 $(0.428 6 \pm 0.003 2)$ mg/g DW, 是白色系中的 2.80 倍。

水母雪莲红色系中花青苷主要有矢车菊素 3-O-己糖苷、矢车菊素 3-丙二酰己糖苷和矢车菊素 3-O-琥珀酰己糖苷, 其含量分别为 $(1.215 4 \pm 0.038 0)$ 、 $(0.226 4 \pm 0.112 0)$ 和 $(1.920 6 \pm 0.059 0)$ mg/g DW, 分别达到干重的 0.12%、0.02% 和 0.19%。较高的花青苷含量是红色系的最主要显色原因, 而白色系中未检测到花青苷(图 3)。

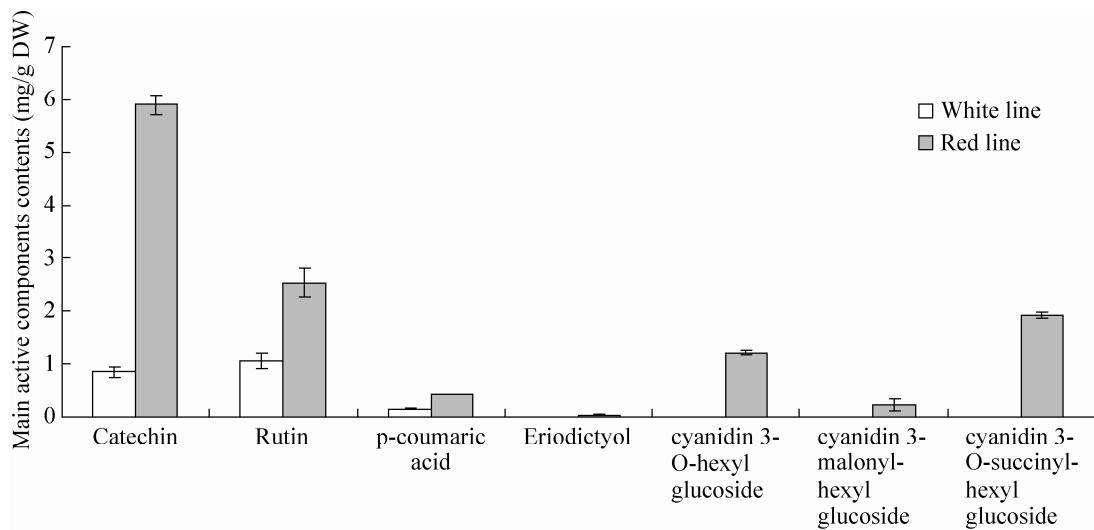


图3 水母雪莲主要活性成分含量分析

Fig. 3 Main active components contents of *S. medusa*.

2.3 水母雪莲两种细胞系类黄酮相关基因表达分析

2.3.1 结构基因表达分析

在类黄酮合成途径各结构基因中, *PAL*、*C4H*和 *4CL* 均属于苯丙素合成途径, 即合成类黄酮前体的代谢酶基因, 细胞系间差异不大。水母雪莲红色系中 *CHS*、*F3'H*、*FNS* 和 *ANS* 基因表达均明显高于白色系, 分别为白色系的 8.57、6.41、7.78 和 6.02 倍。另外 *CHI*、*F3'5'H*、*FLS* 和 *DFR* 基因的表达分别为白色系的 1.75、1.74、2.41 和 3.16 倍。而 *FHT* 基因在红色系中表达水平有所降低 (图 4)。

2.3.2 转录因子表达分析

水母雪莲红色系中 3 种转录因子 *MYB*、*bHLH*、*WD40* 的表达量均比白色系中表达量高, 与类黄酮含量成正相关关系。其中红色系的 *MYB* 基因 (与拟南芥 *AtMYB90* 有较高的同源性) 表达量极高, 为白色系表达量的 19.70 倍; 红色系中 *bHLH* 和 *WD40* 的表达分别为白色系的 6.32

和 6.54 倍。另外, 红色系中 *bHLH* 和 *WD40* 的表达水平成等比关系 (图 5), 但与 *MYB* 的表达水平明显不同, 因此在水母雪莲中可能是 *bHLH* 和 *WD40* 两种转录因子形成了二元复合体, 与 *MYB* 共同参与对类黄酮生物合成相关结构基因表达的调控。

2.4 转录因子与结构基因的表达对类黄酮合成的调控

水母雪莲红色细胞系中转录因子 *MYB*、*bHLH* 和 *WD40* 的表达明显高于白色系中 3 种转录因子的表达。3 种转录因子通过 *MYB* 单独调控和/或 *MBW* 复合体的共同调控^[11,13], 上调了红色系中结构基因 *PAL*、*CHS*、*CHI*、*F3'H*、*F3'5'H*、*FNS*、*FLS*、*DFR* 和 *ANS* 的表达, 其中上调最明显的基因为 *CHS*、*F3'H*、*FNS*、和 *ANS*。查尔酮合成酶 *CHS* 是类黄酮合成途径的限速酶^[10], 结构基因 *CHS* 在红色系中的高水平表达为整个类黄酮合成途径提供了大量的底物, 进而影响到其他类黄酮的合成积累。黄酮醇合成酶 *FLS* 是芦

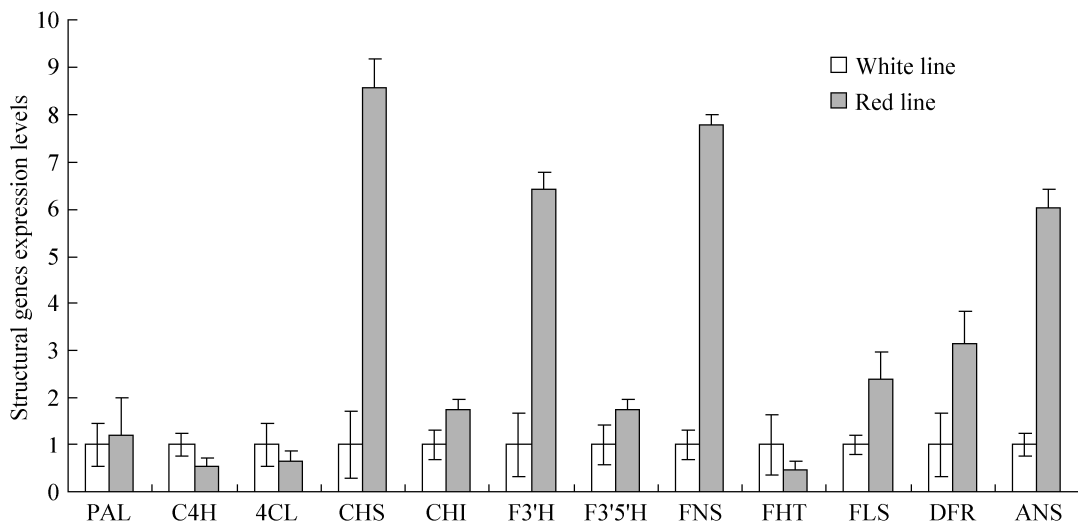


图 4 结构基因表达分析

Fig. 4 Relative expression levels of structural genes in flavonoids pathway.

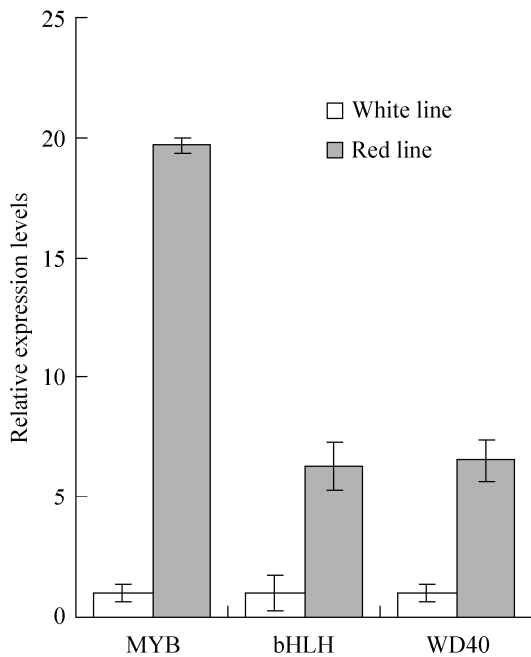


图 5 转录因子基因表达分析

Fig. 5 Relative expression levels of transcription factor genes in flavonoids pathway.

丁合成途径中重要的催化酶^[10], 结构基因 *FLS* 的上调表达引起了红色系中芦丁的积累量的增

加。花青素合成酶 *ANS* 催化无色花青素合成花青素, 进而生成花青素的衍生物^[10], 红色系中 *ANS* 的高水平表达明显地增加了矢车菊素及其衍生物的含量。另外, 红色系中 *F3'H* 和 *DFR* 基因的上调表达也影响了圣草酚和儿茶素的积累。以上结果说明, 红色系中转录因子的高水平表达, 有效地上调了其结构基因的表达, 进而调控了类黄酮的生物积累。刘永刚等^[19]的研究表明水母雪莲细胞的抗氧化活性随细胞中类黄酮含量的增加而增强, 而且在天山雪莲 *Saussurea involucrate* 中类黄酮含量的增加也提高了其抗氧化能力^[3]。水母雪莲红色细胞系中类黄酮含量明显高于白色系, 因此红色系的抗氧化能力等药用活性也相应高于白色系, 其药用价值高于白色系。

3 讨论

植物类黄酮合成途径相关基因的表达不只受到自身的调控, 同时会受到外界环境因子的

影响。强光处理可以激活玉米 *Zea mays* MYB 和结构基因的表达, 低温下苹果 *Malus domestica* MdMYBA 转录因子的表达会增强, 蔗糖处理可以强烈上调花青素苷合成途径相关基因的表达^[20]。本实验中, 水母雪莲白色愈伤组织在低温、高糖和强光条件的诱导下, 表面出现少量深红色愈伤组织, 经过挑选后再培养, 得到稳定遗传的红色系愈伤组织。

相比于水母雪莲白色细胞系, 红色系中含有大量的芦丁、花青苷、儿茶素、对香豆酸和圣草酚等活性成分, 具有降血脂、抗菌消炎、抗氧化、抗衰抗癌、美容养颜的功效^[6,8], 因此水母雪莲红色细胞系有作为保健食品、化妆品和天然色素原料的潜力。

由外植体分化的愈伤组织可以分化为白、红两色细胞系且稳定遗传的现象不仅仅在水母雪莲中出现, 在天山雪莲^[21]、金荞麦 *Fagopyrum dibotrys*^[22]、大花红景天 *Rhodiola coccinea*^[23]等植物中亦有报道, 且这些植物均为类黄酮含量高、具有较高药用价值的植物。水母雪莲的红色愈伤组织相比于白色愈伤组织, 总黄酮含量高且增殖能力明显强于白色系。这对其他药用活性成分为花青苷或类黄酮的药用植物的高保健成分细胞系培养具有一定的借鉴作用。

水母雪莲红色系中类黄酮合成途径相关的结构基因 *CHS*、*F3'H*、*DFR* 和 *ANS* 的表达均明显高于白色系, 同时红色系中也检测到含量丰富的花青苷; 红色系中 *FLS* 基因表达水平是白色系的 2.41 倍, 而红色系中芦丁的含量是白色系中的 2.40 倍。以上结果表明, 类黄酮合成途径中结构基因表达的增强, 提高了红色系中相关产物的含量。MYB、bHLH 和 WD40 这 3 种转录因子通过 MYB 单独调控和/或 MBW 复合

体共同调控生物体内的类黄酮生物合成^[11,13], 红色系中 3 种转录因子 MYB、bHLH 和 WD40 的表达量明显高于白色系, 同时红色系中主要结构基因的表达量也明显高于白色系, 说明红色系中转录因子的高水平表达, 上调了结构基因的表达, 进而调控了类黄酮的生物合成, 提高了水母雪莲红色细胞系的药用价值^[4,19]。

本研究结果表明, 水母雪莲红色系中转录因子 bHLH 和 WD40 的表达水平成等比关系, 但与 MYB 的表达水平相差极大。因此在水母雪莲中, 有可能是 bHLH 和 WD40 两种转录因子形成二元复合体, 进而和 MYB 共同调控类黄酮合成途径中结构基因的表达, 以此调控类黄酮的生物合成。

此外, 在愈伤组织变红的过程中, 我们观察到水母雪莲愈伤组织颜色的转变是从其表面开始的, 可能的原因有: 由于位置效应导致内部激素分布变化, 引起转录因子表达提高^[24-25], 从而对类黄酮途径进行调控; 或者由于基因突变, 引起体内转录因子启动子的去甲基化, 明显增强了转录因子的表达^[26], 进而提高了类黄酮的合成。

REFERENCES

- [1] Yi T, Zhao ZZ, Yu ZL, et al. Comparison of the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of three medicinal plants known as "Snow Lotus" herb in traditional Uighur and Tibetan medicines. *J Ethnopharmacol*, 2010, 128: 405–411.
- [2] Liu CZ, Saxena PK. *Saussurea medusa* cell suspension cultures for flavonoid production. *Methods Mol Biol*, 2009, 547(1): 53–59.
- [3] Fan C, Yue J. Biologically active phenols from *Saussurea medusa*. *Bioorg Med Chem*, 2003, 11:

- 703–708.
- [4] Qiu J, Gao FH, Shen GA, et al. Metabolic engineering of the phenylpropanoid pathway enhances the antioxidant capacity of *Saussurea involucre*. PLoS ONE, 2013, 8(8): e70665.
- [5] Jiang QB, Chen XZ. Extraction of rutin by microwave irradiation with alkali-base and development of compound health care tea from pagoda-tree flowers. J Central South Univ For Tech, 2008, 28(1): 158–161 (in Chinese).
姜清彬, 陈学泽. 2008. 芦丁的提取及槐花复合保健茶的研制. 中南林业科技大学学报, 28(1): 158–161.
- [6] La Casa C, Villegas I, Alarcón LC, et al. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. J Ethnopharmacol, 2000, 71(1/2): 45–53.
- [7] Zhao XL. Research progress of ingredient and healthy function of blueberry. Chin Wild Plant Resour, 2011, 30(6): 19–23 (in Chinese).
赵秀玲. 蓝莓的成分与保健功能的研究进展. 中国野生植物资源, 2011, 30(6): 19–23.
- [8] Zhao X. Research on extraction, purification and reducing blood-fat of natural anthocyanin [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2005 (in Chinese).
赵鑫. 天然花青苷提取纯化及降血脂作用的研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2005.
- [9] Wang YC, Chen S, Yu O. Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 91(4): 949–956.
- [10] Masahiro N, Takashi N. Genetic engineering of flavonoid pigments to modify flower color in floricultural plants. Biotechnol Lett, 2011, 33(3): 433–441.
- [11] Petroni K, Tonelli C. Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs. Plant Sci, 2011, 181(3): 219–229.
- [12] An XH, Tian Y, Chen KQ, et al. The apple WD40 protein MdTTG1 interacts with bHLH but not MYB proteins to regulate anthocyanin accumulation. J Plant Physiol, 2012, 169(7): 710–717.
- [13] Zhao L, Gao LP, Wang HX, et al. The R2R3-MYB, bHLH, WD40, and related transcription factors in flavonoid biosynthesis. Funct Integr Genomics, 2013, 13(1): 75–98.
- [14] Zhao D, Xing J, Li M, et al. Optimization of growth and jaceosidin production in callus and cell suspension cultures of *Saussurea medusa*. Plant Cell Tissue Organ Cult, 2001, 67(3): 227–234.
- [15] Zhao D, Huang Y, Jin Z, et al. Effect of aggregate size in cell cultures of *Saussurea medusa* on cell growth and jaceosidin production. Plant Cell Rep, 2003, 21(11): 1129–1133.
- [16] Li J, Zhang LG, Zhang Y. A study on extraction and determination of total flavonoids in orange colour chinese cabbages. Acta Horti Sin, 2007, 34(4): 923–928(in Chinese).
李娟, 张鲁刚, 张昱. 橙色大白菜球叶总黄酮提取与测定方法的研究. 园艺学报, 2007, 34(4): 923–928.
- [17] Li L, Li HH, Wang YJ, et al. Pigments analysis of *Berberis thunbergii* cv. *atropurpurea* leaves. J Northeast For Univ, 2013, 41(7): 58–62 (in Chinese).
李玲, 李厚华, 王亚杰, 等. 紫叶小檗叶片色素成分分析. 东北林业大学学报, 2013, 41(7): 58–62.
- [18] Li HH, Flachowsky H, Fischer TC, et al. Maize *Lc* transcription factor enhances biosynthesis of anthocyanins, distinct proanthocyanidins and phenylpropanoids in apple (*Malus domestica* Borkh.). Planta, 2007, 226(5): 1243–1254.
- [19] Liu YG, Gao M, Cui JY, et al. Flavonoid biosynthesis and antioxidant activities in the suspension culture of *Saussurea medusa* cells. Acta Bot Bor-Occid Sin, 2005, 25(7): 1421–1427 (in Chinese).
刘永刚, 高敏, 崔建云, 等. 水母雪莲细胞悬浮

- 培养合成黄酮及抗氧化活性. 西北植物学报, 2005, 25(7): 1421-1427.
- [20] Hu K, Han KT, Dai SL. Regulation of plant anthocyanin synthesis and pigmentation by environmental factors. *Chin Bull Bot*, 2010, 45(3): 307-317 (in Chinese).
胡可, 韩科厅, 戴思兰. 环境因子调控植物花青素苷合成及呈色的机理. 植物学报, 2010, 45(3): 307-317.
- [21] Jia JM, Wu CF, Wu LJ. Studies on the production of total flavonoids by the callus of *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. *Res Inform Tradit Chin Med*, 2005, 7(7): 11-15 (in Chinese).
贾景明, 吴春福, 吴立军. 天山雪莲愈伤组织培养与次生代谢物形成的研究. 中药研究与信息, 2005, 7(7): 11-15.
- [22] Liu GD, Zhu QL, Guo YL, et al. The acquisition of high flavonoids-producing callus line and its cDNA library construction of *Fagopyrum dibotrys*. *J Agro-Environ Sci*, 2006, 25(6): 1679-1684 (in Chinese).
- 刘光德, 祝钦泷, 郭余龙, 等. 资源植物金荞麦高类黄酮含量愈伤系的获得及其cDNA文库的构建. 农业环境科学学报, 2006, 25(6): 1679-1684.
- [23] Sha H, Tang F, Gao Y, et al. Callus induction and plant regeneration in *Rhodiola coccinea*. *J Xinjiang Agric Univ*, 2008, 31(3): 58-61 (in Chinese).
沙红, 唐芳, 高燕, 等. 大红红景天愈伤组织的诱导及植株再生体系的建立. 新疆农业大学学报, 2008, 31(3): 58-61.
- [24] Guo JC, Hu XW, Duan RJ. Interactive effects of CKs, light and sucrose on the phenotypes and the syntheses of anthocyanins, lignins in cytokinin over-producing transgenic *Arabidopsis*. *J Plant Growth Regul*, 2005, 24: 93-101.
- [25] Kumar PD, Shin DH, Choi SB, et al. Sugar-hormone cross-talk in anthocyanin biosynthesis. *Mol Cells*, 2012, 34(6): 501-507.
- [26] Wang ZG, Meng D, Wang AD, et al. The methylation of the *PcMYB10* promoter is associated with green-skinned sport in Max Red Bartlett pear. *Plant Physiol*, 2013, 162: 885-896.

(本文责编 郝丽芳)