

茉莉酸甲酯诱导和不同花色红花中羟基红花黄色素 A 积累差异的机制分析

谭政委¹, 李磊¹, 杨红旗¹, 余永亮¹, 许兰杰¹, 董薇¹,
夏伟¹, 马新明², 梁慧珍^{1*}

(1. 河南省农业科学院芝麻研究中心, 河南 郑州 450002; 2. 河南农业大学信息与管理科学学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 通过分析茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 处理对羟基红花黄色素 A (hydroxysafflor yellow A, HSYA) 生物合成相关基因表达影响及不同花色 HSYA 生物合成相关基因表达差异, 为 HSYA 生物合成及调控提供参考。首先用 0、50、100、200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MeJA 对离体培养的红花花冠进行处理, 找出最适 MeJA 处理浓度, 然后用 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 处理红花, 在处理后的 0、3、6、12、24 h 不同时间点采样, 用高效液相色谱法对 HSYA 的含量进行定量分析, 找出最佳处理时间; 以 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 处理 6 h 的红花花冠提取 RNA, 通过 qRT-PCR 对参与 HSYA 生物合成的关键基因进行定量分析, 找出表达差异基因; 用 HPLC 和 qRT-PCR 对不同花色红花品系的 HSYA 含量及其相关合成基因进行定量分析, 找出差异基因。结果表明, 不同浓度的 MeJA 处理均能够显著增加 HSYA 的积累, 其中 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 处理 6 h 后 HSYA 的含量达到最高峰。qRT-PCR 结果显示, MeJA 处理红花花冠能够显著提高 HSYA 合成关键基因 *PAL2*、*PAL4*、*4CL2*、*4CL4*、*4CL5*、*CHS3*、*CHS4* 和 *CHI2* 的转录水平。不同花色红花中 HSYA 含量不同, 呈现红色>橙黄色>黄色>白色的趋势, qRT-PCR 结果表明 *CHS1* 和 *CHI2* 在红色、橙黄色、黄色红花中的表达量明显高于白色。以上研究表明 MeJA 对 HSYA 合成的调控主要通过影响 *PAL2*、*PAL4*、*4CL2*、*4CL4*、*4CL5*、*CHS3*、*CHS4* 和 *CHI2* 的转录水平来实现; *CHS1* 和 *CHI2* 的基因表达差异是不同花色红花 HSYA 含量不同的主要因素。

关键词: 红花; 茉莉酸甲酯; 羟基红花黄色素 A; 表达差异

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)12-2982-07

The mechanism of methyl jasmonate-induced accumulation of hydroxysafflor yellow A in safflower of different colors

TAN Zheng-wei¹, LI Lei¹, YANG Hong-qi¹, YU Yong-liang¹, XU Lan-jie¹, DONG Wei¹,
XIA Wei¹, MA Xin-ming², LIANG Hui-zhen^{1*}

(1. Henan Sesame Research Center, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;
2. College of Information and Management Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To explore the mechanism hydroxysafflor yellow A (HSYA) biosynthesis and regulation, the effect of methyl jasmonate (MeJA) treatment on gene expression related to the biosynthesis of hydroxysafflor yellow A (HSYA) was analyzed, and expression differences in genes involved in HSYA biosynthesis in safflower of different colors was quantified. MeJA at concentrations of 0, 50, 100, and 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ was sprayed onto safflower florets to determine the optimal concentration of MeJA. Safflower was treated with 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA and florets were

收稿日期: 2020-05-09; 修回日期: 2020-06-04.

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金资助 (CARS-21); 河南省农科院创新创意项目 (2020CX03); 河南省农科院优秀青年基金项目 (2020YQ05, 2020YQ28); 河南省博士后基金项目 (001803053); 国家农业科研杰出人才及其创新团队“特种油料作物品质改良创新团队”[农财发 (2016) 45 号].

*通讯作者 Tel: 86-371-65738565, E-mail: lhzh66666@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0705

harvested 0, 3, 6, 12 and 24 h after treatment. The content of MeJA was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). RNA was extracted from safflower florets treated with $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA for 6 h. The transcription of key genes involved in the biosynthesis of HSYA was quantified by qRT-PCR and differentially expressed genes were identified. The content of HSYA increased after treatment with MeJA, with $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA treatment for 6 h having the greatest effect on HSYA accumulation. qRT-PCR results showed that MeJA could significantly increase the transcription of HSYA biosynthesis genes including *PAL2*, *PALA*, *4CL2*, *4CL4*, *4CL5*, *CHS3*, *CHS4* and *CHI2*. The content of HSYA differed between safflowers of different colors with a trend of red>orange-yellow>yellow>white. The results of qRT-PCR showed that the expression of *CHS1* and *CHI2* in red, orange and yellow safflower was significantly higher than that in white safflower. These results indicate that MeJA promotes the accumulation of HSYA by up-regulating the expression of genes involved in the biosynthesis of HSYA such as *PAL2*, *PALA*, *4CL2*, *4CL4*, *4CL5*, *CHS3*, *CHS4* and *CHI2*, and the variation of HSYA content in safflower of different colors was related to a difference in the level of expression of *CHS1* and *CHI2*.

Key words: safflower; methyl jasmonate; hydroxysafflor yellow A; expression difference

红花 (*Carthamus tinctorius* L.), 别名红蓝花、刺红花、草红花, 是菊科红花属一年生双子叶草本植物, 红花作为红花属中唯一的栽培种, 是集油用、药用和工业用于一体的特种经济作物^[1,2]。据《本草纲目》记载, 红花具有“活血、润燥、止痛、散肿通经”的作用。据统计, 《中国药典》2015年版收载含红花的中成药近百种, 中国药典 2015版规定, 作为中药材使用的红花干燥花丝中 HSYA 含量应不低于 1.0%^[3], 因此, 其 HSYA 含量高低直接决定了红花花丝中药材的等级。药理学研究结果表明 HSYA 是红花中最主要的活性成分, 它在治疗心脑血管疾病、糖尿病、抗血栓、抗肿瘤、抗炎、护肝等方面都有很好的作用^[4,5]。

HSYA 和其他类黄酮化合物一样也是通过苯丙氨酸

代谢途径合成, 苯丙氨酸在苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia lyase, PAL)、肉桂酸-4-羟化酶 (cinnamate 4-hydroxylase, C4H)、4-香豆酰辅酶 A 连接酶 (4-coumaroyl CoA ligase, 4CL) 催化下生成香豆酰辅酶 A, 再与 3 分子的丙二酸单酰辅酶 A 在查尔酮合酶 (chalcone synthase, CHS) 的作用下生成查尔酮, 一部分查尔酮在细胞色素 P450 氧化酶 (cytochrome P450, CYP450) 和 C-糖基转移酶 (C-glycosyltransferases, CGTs) 的催化下生成 HSYA 和其他类黄酮查尔酮类化合物, 一部分查尔酮在查尔酮异构酶 (chalcone isomerase, CHI) 的作用下生成柚皮素, 然后在一系列酶的催化下生成黄酮、黄酮醇、花青素等其他黄酮类化合物^[6-8] (图 1)。CHS 被认为是合成红花黄酮类化合物和 HSYA 的

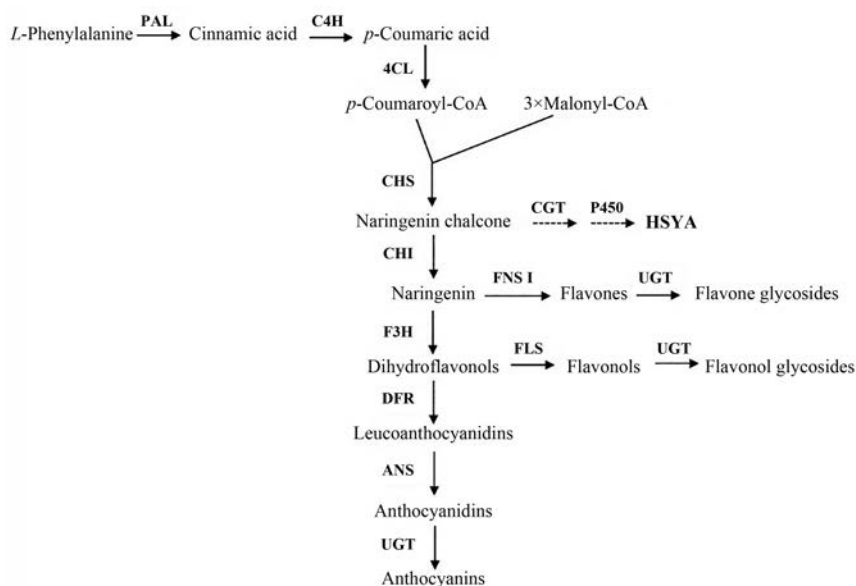


Figure 1 Schematic for the putative biosynthesis pathways of hydroxysafflor yellow A (HSYA) and flavonoids in safflower. PAL: Phenylalanine ammonia lyase; C4H: Innamate 4-hydroxylase; 4CL: 4-Coumaroyl CoA-ligase; CHS: Chalcone synthase; CGT: C-Glucosyltransferase; P450: Cytochrome P450; CHI: Chalcone isomerase; FNS I: Flavone synthase I; F3H: Flavanone 3-hydroxylase; DFR: Dihydroflavonol 4-reductase; ANS: Anthocyanidin synthase; UGT: UDP-glycosyltransferases

关键酶,也是其限速酶,但也有研究表明 PAL、C4H、4CL 的表达量高低也与类黄酮的积累有很大的相关性^[9,10],但到目前为止,对红花中黄酮类化合物的生物合成及调控的研究仍不够深入。

茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 作为一种植物内源激素和信号分子,在植物的生长、发育、免疫调控、次生代谢、生物胁迫和非生物胁迫等方面都发挥着重要作用^[11–14]。大量研究发现,MeJA 通过激活或抑制相应转录因子的活性,调控植物类黄酮^[15]、二萜^[16]、三萜^[17]等多种植物次生代谢的关键酶的基因表达,从而参与植物次生代谢的生物合成过程调控。有研究表明,MeJA 能够诱导 HSYA 积累^[18],另外,有研究发现不同花色红花花丝中 HSYA 含量不同^[19],推测 MeJA 对 HSYA 的诱导积累和不同花色红花中 HSYA 含量差异与 HSYA 生物合成相关基因的表达差异有关,但具体是哪些(个)基因的相关研究还不够深入。本研究用豫红花 1 号作为 MeJA 处理材料,对处理后的 HSYA 含量、相关合成基因进行定量分析,同时对不同花色红花中的 HSYA 生物合成关键基因的表达量进行定量分析,以期 MeJA 调控 HSYA 生物合成及不同花色红花中 HSYA 含量差异的分子机制提供理论参考。

材料和方法

材料 研究材料“豫红花 1 号”及管状花色颜色为白色(W)、黄色(Y)、橙黄色(OY)、红色(R)红花品系种植于河南农业科学院现代农业研究开发基地。茉莉酸甲酯(MeJA)购自上海生工有限公司,HSYA 标准品购自中国食品药品检定研究院,引物为河南尚亚生物技术有限公司合成。

样本处理 以“豫红花 1 号”作为 MeJA 处理材料,为了减小实验误差,选取在大田中开花第一天的顶果球红花花冠连同茎杆一起剪下,放入 1/2 浓度的 Hoagland 标准营养液中,移至光照培养箱中培养,生长条件为 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、16 h/8 h (光照/黑暗),24 h 后进行 MeJA 处理,分别用 0、50、100、200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 喷施红花花序,对照组用 MeJA 溶剂喷施,每个处理设置 3 个生物学重复,在处理后的 0、3、6、12、24 h 取样,液氮速冻保存,用于 RNA 提取和 HSYA 含量测定。

不同花色红花品系的取样 取不同花色红花品系开花第三天的花冠用于 RNA 提取和 HSYA 含量测定,为了减小实验误差,每个花色品系选取 5~10 株上的花序均匀混合,取 3 个生物学重复。

HSYA 标准曲线制定 称 HSYA 标准品 10.0 mg,加 25% 甲醇溶解并于 10 mL 容量瓶中定容,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取滤液供 HPLC 测定使用。分别吸取

HSYA 对照品溶液 0.25、0.50、0.75、1.0、2.0、4.0 mL 置于 10 mL 容量瓶中,加 25% 甲醇定容至刻度,混匀,取 9 μL 进样。色谱条件参考杨玉霞等^[13]方法,并稍作修改:色谱柱:Agilent C18 柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm);检测波长:403 nm;流动相:甲醇-乙腈-0.7% 的磷酸水溶液 (26:2:72);流速:1.0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$;柱温:30 $^\circ\text{C}$;进样量:10 μL 。

样本中 HSYA 含量测定 精密称取红花样品粉末 100 mg,精密量取 25% 甲醇 10 mL,称量,25 $^\circ\text{C}$ 超声 (300 W, 50 kHz) 处理 40 min,取出后称重并补足失重。用 0.45 μm 滤膜过滤得供试品溶液。Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm);以甲醇-乙腈-0.7% 磷酸溶液 (26:2:72) 为流动相等度洗脱;检测波长 403 nm;流速 1.0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$;柱温 30 $^\circ\text{C}$;进样量 10 μL 。

样品总 RNA 提取及逆转录反应 按照华越洋生物公司的 Quick RNA Isolation Kit 试剂盒说明书提取样品的总 RNA;按照天根生物科技有限公司的 Fast Quant RT Super Mix 说明书进行逆转录反应。

Real-time PCR 分析 采用 Eppendorf Mastercycler ep Realplex 2.2 Detection System 进行实时荧光定量 PCR,根据红花转录组数据^[20]和参考文献^[21]设计 PAL1、PAL2、PAL3、PAL4、PAL5、C4H1、4CL1、4CL2、4CL3、4CL4、4CL5、CHS1、CHS2、CHS3、CHS4、CHS5、CHI1、CHI2 基因的特异引物,以 *Ct60s* 作为内参基因,引物序列如表 1 所示。用天根生物公司的 Super Real Pre Mix (SYBR Green) 试剂盒进行荧光定量 PCR 反应,扩增体系 20 μL : 2 \times SuperReal Pre Mix 10 μL 、上游引物 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.5 μL 、下游引物 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.5 μL 、cDNA 模板 5 μL 、ddH₂O 3 μL 。荧光定量 PCR 条件设置反应程序:95 $^\circ\text{C}$ 变性 20 s、55 $^\circ\text{C}$ 退火 20 s、72 $^\circ\text{C}$ 延伸 20 s 扩增 45 个循环。

数据分析 用 2^{- $\Delta\Delta\text{CT}$} 相对定量方法计算出各基因的相对表达量,用标准曲线法对样品的 HSYA 含量进行定量分析。用单因素方差对样品的基因表达和 HSYA 含量进行统计分析,结果以平均值 \pm 标准差的形式表示, $P < 0.05$ 表示差异具有显著水平。

结果与分析

1 适度的 MeJA 处理能够促进红花管状花中 HSYA 的积累

为了确定 MeJA 对 HSYA 的积累是否有影响及最适处理浓度,采用不同浓度 (0、50、100、200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对红花进行喷施处理,为了减少在自然环境中外界因素如光照、温度、风力等变化对激素处理的影响,选取开

Table 1 The primers sequences used for real-time PCR

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>PAL1</i>	TGGAAGCCGTAATCCAAGTC	TCCGTGAAGAAATCAACCCT
<i>PAL2</i>	ACGAGGTGAAGAAGATGGTGG	AGCCCTAGCTGATCCGACA
<i>PAL3</i>	AAGTCTATCGGCCCTCTTC	CGTAATCGCTTCCATCCAAA
<i>PAL4</i>	GCTTGACAGATCATAACCATTA	GGAACACCATTCCAACCCTC
<i>PAL5</i>	GAAATGGACCCACTGGAGAA	CGTGTAGGGCTTTGTTTCTTG
<i>C4H1</i>	TTGGGAGCACGAAGAAGATG	TGTCTCGATTGCAGCAACAT
<i>4CL1</i>	TGCTCTGCCATCTCCTCTG	TAGCCCTAATATCGTGACTTTG
<i>4CL2</i>	AGAACATTGAGAAACATAG	GAAGGGAACCTTCTTGGCACA
<i>4CL3</i>	TGTAAGAAGTCAATGTGTCA	ACCGTGTTCATCAATAGTT
<i>4CL4</i>	TTCGCTAAGGAGCCATTTGA	TGATTTGGTACCACGGATA
<i>4CL5</i>	AGCACGCTGGAGGAAATGAT	CAACTGGAACCGTCCGAGAA
<i>CHS1</i>	GGTACCGGATCTCTAGAAGAT	TTCTGATCTCGGCAATATCGGT
<i>CHS2</i>	GATCAATGGCAACGGTGTAGT	AAATAGCCTTCGACCAAGCA
<i>CHS3</i>	AGACCAGATACACAGTAATG	GCTTCCTTTGCCATCT
<i>CHS4</i>	CTCGTCTTCTGCACCACCTC	TGTTCTCGGCTAGGTCCTT
<i>CHS5</i>	GACTCTTCGACAACAACCT	TGCCAACTTCTCTTTCAT
<i>CHI1</i>	TCCGACTCAACTACAATGGC	TCCGGTAAACTTCACGAACC
<i>CHI2</i>	AACAACGCCCGATGGATTAG	TTCGCTTCAGGAGAAACACC
<i>Ct60s</i>	GGCAACACTGGTCTTGATCCAT	CTGCGATTGTTGGATAATGGATG

花一致的红花花序, 连同茎秆一同剪下后置于营养液中稳定培养 24 h 后进行 MeJA 喷施处理, 在处理 3 h 后, 通过液相色谱对红花管状花中的 HSYA 含量进行定量分析, 结果显示 MeJA 处理能够显著增加 HSYA 的积累, 其中 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MeJA 处理对 HSYA 促进效果最为明显 (图 2A), 所以, 在后续的实验中选择该浓度 MeJA 对红花进行处理。

为了进一步验证适度的 MeJA 处理能够提高红花 HSYA 的含量, 用 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MeJA 对红花进行了不同时间处理, 结果表明, 随着不同时长处理, 红花 HSYA 的积累呈现升高的趋势, 其中处理 6 h 后, HSYA 的含量达到高峰 (图 2B), 这一结果进一步证明了适度的 MeJA 处理能够促进红花中 HSYA 的积累。

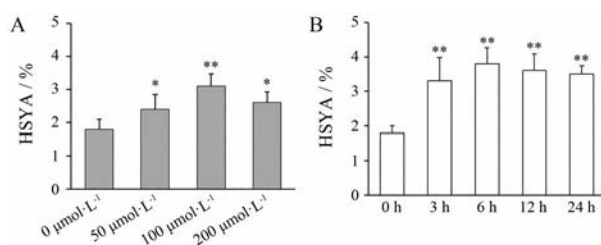


Figure 2 Effect of different concentration of MeJA (A) and different treatment time (B) on HSYA content. A: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; B: ** $P < 0.01$ vs 0 h. MeJA: Methyl jasmonate

2 MeJA 处理对 HSYA 合成相关基因的影响

通过 HSYA 的结构推测其合成的最初底物是查尔酮, 为了进一步研究 MeJA 处理对红花 HSYA 积累的分子机制, 通过红花转录组数据及文献检索的方式, 找到了可能参与红花 HSYA 合成的相关基因, 以 MeJA 处

理 6 h 的红花管状花为材料提取 RNA, 并以喷施 MeJA 溶剂的红花为对照材料, 通过荧光定量 PCR 对参与查尔酮合成前后的 18 个基因进行定量分析。定量分析结果 (图 3) 表明, 与对照组 (mock) 相比, MeJA 处理组中大部分基因的表达量都有所升高, 其中 *PAL2*、*PAL4*、*4CL2*、*4CL4*、*4CL5*、*CHS3*、*CHS4* 和 *CHI2* 的表达量显著升高。其中 *CHS* 是参与植物查尔酮合成的最为关键酶, 被认为是植物类黄酮合成途径的第一个酶, 而 HSYA 的合成是以查尔酮为底物, 因此, 推测 MeJA 主要通过提高 *PAL2*、*PAL4*、*4CL2*、*4CL4*、*4CL5*、*CHS3*、*CHS4*、*CHI2* 的转录水平参与调控 HSYA 的生物合成过程, 其中 *CHS3*、*CHS4* 的表达量升高可能是 MeJA 诱导 HSYA 积累的主要因素。

3 不同花色红花品种中 HSYA 含量的分析

研究室前期在红花种质资源收集与评价的研究过程中, 发现大量管状花花色变异的种质资源, 根据红花管状花颜色可以将红花种质资源大体分为 4 类, 分别为白色 (W)、黄色 (Y)、橙黄色 (OY) 和红色 (R) (图 4), 对不同花色红花品系的 HSYA 含量进行测定, 结果表明, 白色红花中未检测到 HSYA, 黄色 (Y)、橙黄色 (OY) 和红色 (R) 中 HSYA 含量较高, 并呈现 $R > OY > Y > W$ 的趋势, 但 OY、Y 和 W 中 HSYA 的含量差异并不明显 (图 5)。

4 不同花色红花品种中 HSYA 合成关键基因表达分析

为了研究在不同红花品系中 HSYA 积累差异的分子机制, 对不同花色红花中 HSYA 合成的关键基因进行了定量分析, 荧光定量 PCR 分析结果显示, *PAL3*、

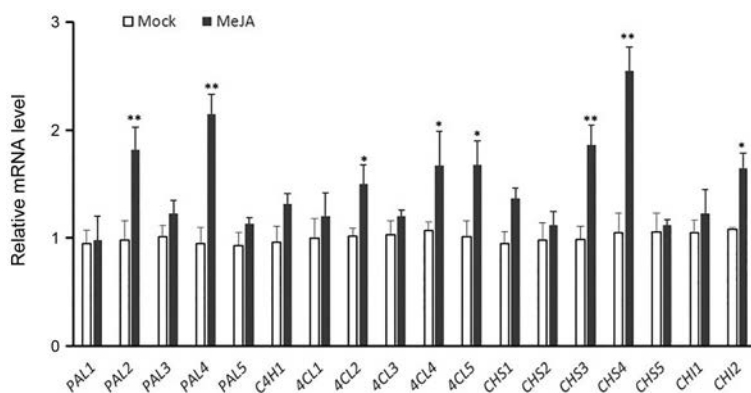


Figure 3 Effect of MeJA treatment on expression of related genes involved in HSYA biosynthesis. * $P < 0.05$, ** $P < 0.05$ vs Mock



Figure 4 The phenotype of safflower with different colors (white, yellow, orange-yellow, red)

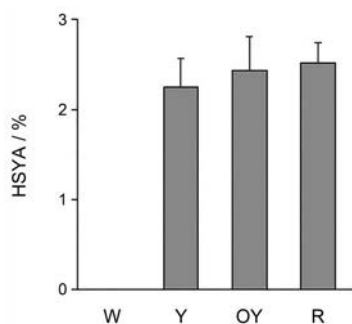


Figure 5 The content of HSYA in safflower with different colors. W: White; Y: Yellow; OY: Orange-yellow; R: Red

PAL4、*CL5*、*CHS1*、*CHS3* 和 *CHI2* 在红色、橙黄色和黄色红花品系中明显高于白色红花品系，其中 *CHS1* 和 *CHI2* 的表达量达到显著水平 (图 6)，但 *PAL3*、*PAL4*、*CL5*、*CHS1*、*CHS3* 和 *CHI2* 的基因表达量在红色、橙黄色和黄色红花品系中表达差异不明显。

讨论

红花 (*Carthamus tinctorius* L) 是一种重要的药用植物，其花丝和种子是传统中药材，广泛应用于预防和治疗心脑血管疾病、骨质疏松症及妇科等疾病，目前，从

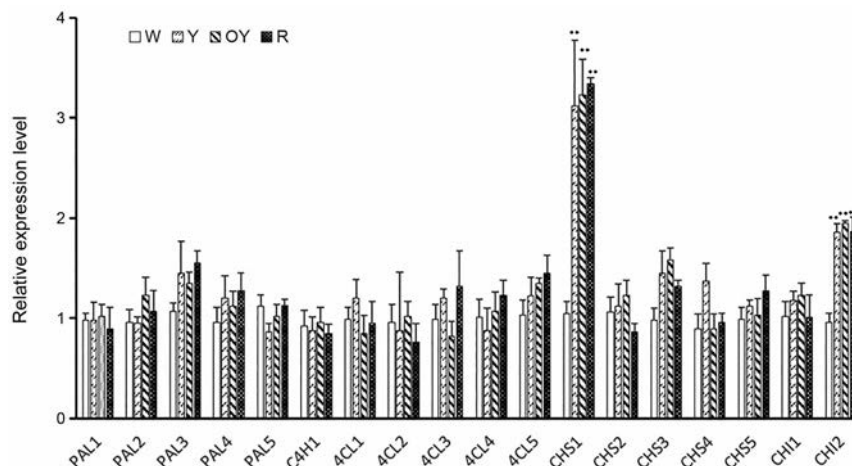


Figure 6 Quantitative analysis of the expression of related genes involved in HSYA biosynthesis in safflower with different colors. ** $P < 0.05$ vs white safflower

红花中分离的化学成分超过 100 种, 主要包括类黄酮、生物碱、有机酸等^[22], 其中醌式查尔酮糖苷类化合物是红花中特有的化学成分, 也构成红花红色素和黄色素的主要成分, 这些化合物具有很强的药理学活性, 其中 HSYA 是药理学活性最强的成分, 临床上广泛应用于治疗心、脑血管疾病的花红黄色素注射液的主要成分之一就是 HSYA^[23]。因此 HSYA 含量的高低直接决定了中药材红花花丝的等级标准, 如何提高红花 HSYA 含量也是红花遗传育种改良的主要目标之一, 但目前关于红花 HSYA 生物及合成调控的研究相对较少。

MeJA 作为一种植物内源性激素, 在植物的次生代谢调控中起重要作用, MeJA 广泛应用于悬浮培养细胞中诱导产生目标次生代谢产物, 如雷公藤素^[24]、丹参酚酸类化合物^[14]等。在本研究中, 适度外施 MeJA 处理红花花冠, 可以提高红花 HSYA 含量, 另有研究表明, MeJA 处理红花可促使红花中芦丁、山柰酚-3-O- β -芸香糖苷、红花红色素等类黄酮化合物的积累^[8], 这说明 MeJA 作为外源诱导子有利于红花类黄酮的积累。本研究为了更加深入地了解 MeJA 对 HSYA 的调控, 综合分析了 18 个与 HSYA 合成相关的基因, 结果显示, MeJA 处理使 *PAL2*、*PAL4*、*4CL2*、*4CL4*、*4CL5*、*CHS3*、*CHS4* 和 *CHI2* 的转录水平明显调高, 植物中 CHS 家族一般包含多个基因, 这些基因通过不同的调控方式参与植物抗逆、生长发育等生理过程, Guo 等^[21]通过花粉管导入法在红花中过表达 *CHS1* 基因可以显著增加红花醌式查尔酮类化合物的含量, 本研究中发现 MeJA 处理后 *CHS3* 和 *CHS4* 的转录水平和 HSYA 含量都明显升高, MeJA 对 *CHS1* 基因表达只有微弱的诱导作用, 这说明 *CHS3* 和 *CHS4* 也参与 HSYA 生物合成, 提示 MeJA 对 HSYA 的诱导作用主要通过 *CHS3* 和 *CHS4* 基因实现。

另外, 在红花种质资源的收集鉴定过程中, 发现大量花色变异的红花种质资源, 定量分析发现不同花色红花品系的 HSYA 含量有一定差异性, 红色、橙黄色和黄色红花品系中 HSYA 含量明显高于白色红花, 本研究通过对 HSYA 合成的关键基因的表达进行定量分析, 初步找到了影响 HSYA 在不同花色红花中含量差异的潜在候选基因, 与 MeJA 诱导 *PAL2*、*PAL4*、*4CL2*、*4CL4*、*4CL5*、*CHS3*、*CHS4* 和 *CHI2* 等基因的转录水平提高从而使 HSYA 含量升高的机制不同, *CHS1* 和 *CHI2* 的转录水平在不同花色红花中存在明显差异, 红色、橙黄色和黄色红花品系中 *CHS1* 和 *CHI2* 基因的表达水平明显高于白色, 因为 CHS 催化产物是 HSYA 合成的直接底物, 所以推断 *CHS1* 在不同花色红花中的表达差异是不同花色红花 HSYA 含量差异的因素之

一。但 qRT-PCR 结果显示 *CHS2*、*CHS3*、*CHS4* 和 *CHS5* 在白色红花品系中也有一定的表达量, 但白色红花中检测不到 HSYA, 说明其他参与 HSYA 生物合成的下游基因如 *CGT*、*P450* 在白色红花中存在功能或表达缺失。

综上所述, 外源 MeJA 刺激可提高 HSYA 含量及该合成途径中关键基因的表达, 为今后进一步研究外源诱导子影响 HSYA 次生代谢途径机制提供了依据, 不同花色红花 HSYA 含量差异的机制探讨, 为红花品种的遗传改良提供了一定参考。

作者贡献: 谭政委和梁慧珍设计了本实验, 李磊和杨红旗完成实验材料种植、采样和处理, 余永亮、许兰杰、董薇、夏伟完成了样品 HSYA 定量测定、基因的定量分析, 谭政委和李磊完成了数据分析、论文初稿的写作, 梁慧珍和马新明指导论文写作与修改。

利益冲突: 本文的研究内容无任何利益冲突。

References

- [1] Pearl SA, Bowers JE, Reyes-Chin-Wo S, et al. Genetic analysis of safflower domestication [J]. *BMC Plant Biol*, 2014, 14: 43.
- [2] Pearl SA, Burke JM. Genetic diversity in *Carthamus Tinctorius* (Asteraceae; safflower), an underutilized oilseed crop [J]. *Am J Bot*, 2014, 101: 1640-1650.
- [3] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Vol 1. Beijing: China Medical Science Press, 2015.
- [4] Li CY, Yin JG, Zhang J, et al. Pharmacokinetic profiles of hydroxysafflor yellow A following intravenous administration of its pure preparations in healthy Chinese volunteers [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 162: 225-230.
- [5] Chen Z, Liu L, Liu Y, et al. Hydroxysafflor yellow A induces autophagy in human liver cancer cells by regulating Beclin 1 and ERK expression [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19: 2989-2996.
- [6] Kazuma K, Takahashi T, Sato K, et al. Quinochalcones and flavonoids from fresh florets in different cultivars of *Carthamus tinctorius* L [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64: 1588-1599.
- [7] Li H, Dong Y, Yang J, et al. *De novo* transcriptome of safflower and the identification of putative genes for oleosin and the biosynthesis of flavonoids [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e30987.
- [8] Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology [J]. *Plant Physiol*, 2001, 126: 485-493.
- [9] Chen GJ, Liu HP, Wei Q, et al. The acyl-activating enzyme PhAAE13 is an alternative enzymatic source of precursors for anthocyanin biosynthesis in petunia flowers [J]. *J Exp Bot*, 2017, 68: 457-467.
- [10] Dehghan S, Sadeghi M, Poppel A, et al. Differential inductions

- of phenylalanine ammonialyase and chalcone synthase during wounding, salicylic acid treatment, and salinity stress in safflower, *Carthamus tinctorius* [J]. Biosci Rep, 2014, 34: e00114.
- [11] Howe G, Jander G. Plant immunity to insect herbivores [J]. Annu Rev Plant Biol, 2008, 59: 41-66.
- [12] Glazebrook J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens [J]. Annu Rev Phytopathol, 2005, 43: 205-227.
- [13] Browse J, Howe GA. New weapons and a rapid response against insect attack [J]. Plant Physiol, 2008, 146: 832-838.
- [14] Browse J. Jasmonate: an oxylipin signal with many roles in plants [J]. Vitam Horm, 2005, 72: 431-456.
- [15] Luo XP, Zhu DY, Huang YJ, et al. Effects of methyl jasmonate accumulation of flavonoids and related gene expression of Buckwheat Sprouts [J]. Gen Appl Biol (基因组学与应用生物学), 2015, 34: 1040
- [16] Wang XY, Cui GH, Huang LQ, et al. Effects of methyl jasmonate on accumulation and release of tanshinones in suspension cultures on *Salvia miltiorrhiza* hairy root [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2007, 32: 300-302.
- [17] Peng L, Yan YG, Chen Y, et al. Transcriptome analysis of *Polygala tenuifolia* seedlings induced by methyl jasmonate and mining of key genes for triterpenoid biosynthetic pathway [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2020, 51: 2517-2529.
- [18] Xu LJ, Liang HZ, Yu YL, et al. *Carthamus tinctorius* L.: evaluation on correlations of hydroxysafflor with flower color and the difference among cultivars [J]. Chin Agric Sci Bull (中国农学通报), 2018, 34: 41-45.
- [19] He BX, Xue YR, Tu YH, et al. *CtCHS4* induces the accumulation of safflower quinone chalcones in response to methyl jasmonate induction [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 636-645.
- [20] Chen J, Tang XH, Ren CX, et al. Full-length transcriptome sequences and the identification of putative genes for flavonoid biosynthesis in safflower [J]. BMC Genomics, 2018, 19: 548.
- [21] Guo DD, Xue YR, Li DQ, et al. Overexpression of *CtCHS1* increases accumulation of quinochalcone in safflower [J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 1409.
- [22] Zhang LL, Tian K, Tang ZH, et al. Phytochemistry and pharmacology of *Carthamus tinctorius* L [J]. Am J Chin Med, 2016, 44: 197-226.
- [23] Li CY, Yin JG, Zhang J. Pharmacokinetic profiles of hydroxysafflor yellow A following intravenous administration of its pure preparations in healthy Chinese volunteers [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 162: 225-230.
- [24] Su P, Guan HY, Zhao YJ, et al. Identification and functional characterization of diterpene synthases for triptolide biosynthesis from *Tripterygium wilfordii* [J]. Plant J, 2018, 93: 50-65.