

淫羊藿属植物查耳酮合成酶启动子序列的克隆及比较分析

刘谊兰¹, 曾少华², 王瑛^{1*}

(1. 中国科学院武汉植物园, 中国科学院植物种质创新与特色农业重点实验室, 武汉 430074; 2. 中国科学院华南植物园, 中国科学院植物资源保护与可持续利用重点实验室, 广州 510650)

摘要:采用 TAIL-PCR 技术从箭叶淫羊藿(*Epimedium sagittatum*)叶片中克隆得到查耳酮合成酶基因(Chalcone synthase)的启动子, 命名为 *ECHSP*, 长度为 750 bp, 其具有 TATA BOX、CAAT BOX、MYB 结合位点、MYC 结合位点等元件。对箭叶淫羊藿、木鱼坪淫羊藿(*E. franchetii*)、粗毛淫羊藿(*E. acuminatum*)、直距淫羊藿(*E. mikinorii*)、黔岭淫羊藿(*E. leptorrhizum*)等 5 种植物的 *CHS* 启动子序列进行比较分析, 结果表明, *CHS* 启动子的核苷酸多态性丰富, 表明 *CHS* 的表达可能受到多种因素的灵活调节。*ECHSP* 与其他植物的 *CHS* 启动子序列进行比较, 其 TATA box 的位置可能与黄酮类化合物的积累相关。此外, 进化分析表明 *ECHSP* 的核苷酸序列可应用于淫羊藿属植物的系统进化研究。

关键词:淫羊藿属; 查耳酮合成酶基因; 启动子克隆; 系统进化

中图分类号: Q943.2 文献标识码: A 文章编号: 1005-3395(2011)06-0499-07

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2011.06.002

Cloning and Comparative Analysis of Promoters of Chalcone Synthase Gene in *Epimedium* L.

LIU Yi-lan¹, ZENG Shao-hua², WANG Ying^{1*}

(1. Key Laboratory of Plant Germplasm Enhancement and Specialty Agriculture, Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China; 2. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: Chalcone synthase is an important enzyme in the flavonoid pathway. The promoter of *CHS* from *Epimedium sagittatum* had been cloned and named *ECHSP*. There were TATA BOX, CAAT BOX, MYB recognition sites and MYC recognition sites in the promoter region. The promoters of *CHS* from five *Epimedium* species, such as *E. sagittatum*, *E. franchetii*, *E. acuminatum*, *E. mikinorii*, *E. leptorrhizum*, had rich polymorphism, which suggested that the transcriptional level of *CHS* might be affected by various factors. Compared with the promoters of *CHS* from other species, the position of TATA box in *ECHSP* might have relation with the accumulation of flavonoids. Furthermore, phylogenetic analysis indicated that the *ECHSP* sequences could be used to analyze the evolutionary relationships of *Epimedium* L. by phylogenetic analysis.

Key words: *Epimedium*; Chalcone synthase; Promoter clone; Phylogenetic analysis

淫羊藿属(*Epimedium* L.)全球大约有 60 种植物, 为多年生草本植物, 在亚洲和欧洲都有分布。淫羊藿具有补肾阳、强筋骨、祛风湿等功效, 而且还有抗衰老、改善免疫功能、抑制肿瘤等功效, 因而也是最

收稿日期: 2011-03-25 接受日期: 2011-04-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(30900076); 中国科学院、国家外国专家局创新团队国际合作伙伴计划项目(0921101001); 湖北省杰出青年科学基金项目(2009CDA073)资助

作者简介: 刘谊兰, 硕士, 主要从事类黄酮代谢途径相关的研究, email: liuyilan11@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, email: yingwang@wbgcas.cn

具开发潜力的中药材之一^[1]。此外,其花色,花型,叶型都具有重要的观赏价值,欧美国家已经开展了淫羊藿属植物观赏资源的选育和产业化发展。类黄酮不仅是淫羊藿叶片中的药效成分,而且也是其花色素的主要成分。了解淫羊藿属植物的类黄酮代谢途径的代谢机理,对于调控其黄酮类物质的合成,改善园艺品种的观赏品质都具有重要的意义。

关于黄酮类途径(Flavonoids pathway)的生物合成、调控及其运输等分子机制研究越来越深入。查耳酮合成酶(Chalcone synthase, CHS)是类黄酮代谢途径中的第一个合成酶^[2],对整个类黄酮代谢途径起着重要的调节作用。导入了 *CHS* 基因和黄酮醇合成酶(Flavonol synthase)基因(*FLS*)的转基因番茄(*Lycopersicon esculentum*),其果实的黄酮醇含量有了显著提高^[3]。研究表明查耳酮合成酶基因的表达受紫外^[4]、光^[5]的诱导和干旱胁迫等因素的调节。作为我国传统中药材的淫羊藿,其主要的次生代谢产物为类黄酮,其药效成分淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B 和朝藿定 C 亦都属于类黄酮物质^[1],查耳酮合成酶基因 *CHS* 作为类黄酮代谢途径的第一个结构基因,查耳酮合成的量直接影响到淫羊藿药效成分的含量,因此对 *CHS* 表达调控的研究对于了解整个类黄酮代谢途径是十分重要的。作为新兴的园艺植物,淫羊藿的叶片和花瓣颜色都与其体内的类黄酮物质的种类和含量紧密相关,*CHS* 的表达也影响着淫羊藿叶片及花瓣颜色。此外,目前淫羊藿属的分类系统仍不清晰,成为淫羊藿基础研究的一个瓶颈。本研究从淫羊藿属 5 种植物中克隆了 *CHS* 的启动子区域,并进行了进化分析,探讨了淫羊藿属植物的分子分类和系统发育关系,为查耳酮合成酶的调控机制研究以及淫羊藿育种和利用基因工程改良淫羊藿品质奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试植物箭叶淫羊藿(*E. sagittatum* Stearn.)、木鱼坪淫羊藿(*E. franchetii* Stearn.)、粗毛淫羊藿(*E. acuminatum* Franch.)、直距淫羊藿(*E. mikinorii* Stearn.)、黔岭淫羊藿(*E. leptorrhizum* Stearn.)均采自中国科学院武汉植物园实验基地。

1.2 DNA 的提取和启动子的克隆

采集淫羊藿属 5 种植物的幼嫩叶片用液氮研磨充分,采用 CTAB 法^[6]提取基因组 DNA,提取时

在抽提液中加入巯基乙醇。

采用 TAIL-PCR 方法^[7]扩增启动子序列。选取了 8 对随机引物 AD1: 5'-NTCGASTWTSWGTT-3', AD2: 5'-NGTCGASWGANAWGAA-3', AD3: 5'-WGTGNAGWANCANAGA-3', AD4: 5'-AGWGNAGWANCAGAGG-3', AD5: 5'-NGTAWAASGINTSCAA-3', AD6: 5'-NGACGASWGANAWGAC-3'^[7], Tail-AD7: 5'-GTNCGASWCANAWGTT-3', Tail-AD8: 5'-NCAGCTWSCTNTSCTT-3'^[8],根据本实验室已获得的 *CHS* 基因序列设计三轮槽式引物: CHSP1: 5'-ACCCATTCTTTGATTGCCTTTGTT-3', CHSP2: 5'-GTAAACGCTTCTTGATCTGCGACTTG-3', CHSP3: 5'-TCAGCCCTTTGTGCCTTGCGAACCT-3'。

PCR 反应体系为 25 μ L, 第一轮 (Pre-amplification)反应的模板为 75 ng 基因组 DNA, 10 $\times$ LA 缓冲液 2.5 μ L, 10 mmol/L dNTPs 2 μ L, 基因特异引物 CHSP1 2 μ L, AD 引物 1 μ L, LA *Taq* 聚合酶 0.1 μ L, ddH₂O 12.4 μ L; 第二轮 (Primary TAIL-PCR reactions)反应体系包含 10 $\times$ LA 缓冲液 2.5 μ L, 10 mmol/L dNTPs 4 μ L, 基因特异引物 CHSP2 2 μ L, AD 引物 1 μ L, LA *Taq* 聚合酶 0.1 μ L, ddH₂O 12.4 μ L 以及第一轮扩增产物稀释 50 倍后的模板溶液 3 μ L; 第三轮 (Secondary TAIL-PCR reactions)反应体系包含 10 $\times$ LA 缓冲液 2.5 μ L, 10 mmol/L dNTPs 4 μ L, 基因特异引物 CHSP3 2 μ L, AD 引物 1 μ L, LA *Taq* 聚合酶 0.1 μ L, ddH₂O 12.4 μ L 以及第二轮扩增产物稀释 50 倍后的模板溶液 3 μ L。

第三轮 PCR 扩增反应结束后,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,选取单一条带回收纯化后连接到 pMD19-T 载体上,将连接好的产物加至大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞,充分混匀,冰上放置 30 min, 42 $^{\circ}$ C 热激 90 s, 再冰上放置 3 min, 加入 600 μ L LB 培养液,于 37 $^{\circ}$ C 以 120 r min⁻¹ 旋转培养 45 min, 然后将 100 μ L 菌液涂布在含有安卡青霉素的平板上,在 37 $^{\circ}$ C 下培养 12 h, 挑取阳性克隆子,经 PCR 检测后送至华大基因中心测序。获得的序列经生物信息学数据库和互联网上的软件进行确认和序列分析。

1.3 不同物种中 *CHS* 启动子的克隆

根据所得到的启动子序列设计上游引物 PCHSF: 5'-TCTCCTATCCGATATTTCTCGCCTTTC-3', 下游 PCHSR: 5'-GCCCTTTGTGCCTTGCGAACCTCTT-3'。PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s,

60℃30 s, 72℃1 min, 35 个循环。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 经回收纯化后连接到 pMD19-T 载体上, 按上述的热激法进行转化, 挑取阳性克隆子, PCR 检测后送至华大基因中心测序, 获得 5 种淫羊藿植物的 *ECHSP* 序列。

1.4 其他物种启动子的获得

不同物种 *CHS* 的拷贝数可能不同, 淫羊藿的进化地位位于双子叶的基部, 采用 Blast 的方法, 在 <http://www.phytozome.net/> 中搜索单子叶和双子叶模式植物中的同源基因, 鉴于这些物种都具有全基因组序列, Blast 结果中同源性最高的即作为搜索序列的直系同源基因, 再根据编码区的序列, 获得全基因组中编码区前 750 bp 的启动子序列。

1.5 启动子序列分析和进化树构建

将从 5 种淫羊藿植物中克隆得到的 *CHS* 启动子区和其他植物的 *CHS* 启动子区用 <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.htm> 分析转录因子结合位点的种类和数量。此外, 对 5 种淫羊藿植物的 *CHS* 启动子区用 MEGA 4.0 构建进化树。

2 结果和分析

2.1 *ECHSP* 的克隆和分析

根据已知的 *CHS* 序列^[9], 设计了 3 个槽式引物, 与植物中通用的随机引物配对, 对箭叶淫羊藿进行 TAIL-PCR。第一轮反应产物检测, 所有引物对都能扩增出多条带, 第二轮产物检测时条带减少但没有出现单一条带, 第三轮产物检测时, 与 AD2 配对的引物出现了单一条带。将单一条带切胶回收纯化, 经连接转化和筛选阳性克隆, 送样测序, 得到的序列能成功与原序列拼接, 证明所得的长度为 750 bp 的序列即是 *CHS* 的启动子区域, 命名为 *ECHSP*。从图 1 可见, *ECHSP* 具有典型的真核生物启动子的结构, 有 2 个 TATA BOX, 3 个 CAAT BOX, 1 个 CGCG BOX。此外启动子区还具有丰富的受光照、紫外线、干旱和激素等因素调节的转录因子结合位点, 例如 GT1、CARES、I BOX、W BOX 等; 并且具有丰富的 MYB 和 MYC 转录因子结合位点, 这两类转录因子已经证实为直接调控类黄酮代谢的转录因子^[10]。



图 1 箭叶淫羊藿 *ECHSP* 启动子序列

Fig. 1 Promoter sequence of *CHS* from *Epimedium sagittatum*

2.2 淫羊藿 5 种植物的 *ECHSP* 序列比较

根据获得的箭叶淫羊藿 *ECHSP* 序列,设计引物,从 5 种淫羊藿属植物中扩增得到 *ECHSP* 同源片段,经序列校正后进行序列分析(图 2)。结果表明,在直距淫羊藿(*E. mikinorii*)起始密码子上游的-179 bp处发生了碱基变异 T→G,导致 MYBIAT 的识别位点消失,-445 bp 处发生了碱基变异 C→T,

导致 CGCGBOXAT 位点消失;粗毛淫羊藿(*E. acuminatum*)起始密码子上游的-446 bp 处发生了碱基变异 A→T,导致 CGCGBOXAT 位点消失;黔岭淫羊藿(*E. leptorrhizum*)起始密码子上游的-19 bp处发生了碱基变异,但仍可被 MYBCORE 识别;粗毛淫羊藿的-292 bp 处发生了碱基变异 T→G,但仍可被相应转录因子识别。此外,不同物种的 CAAT BOX

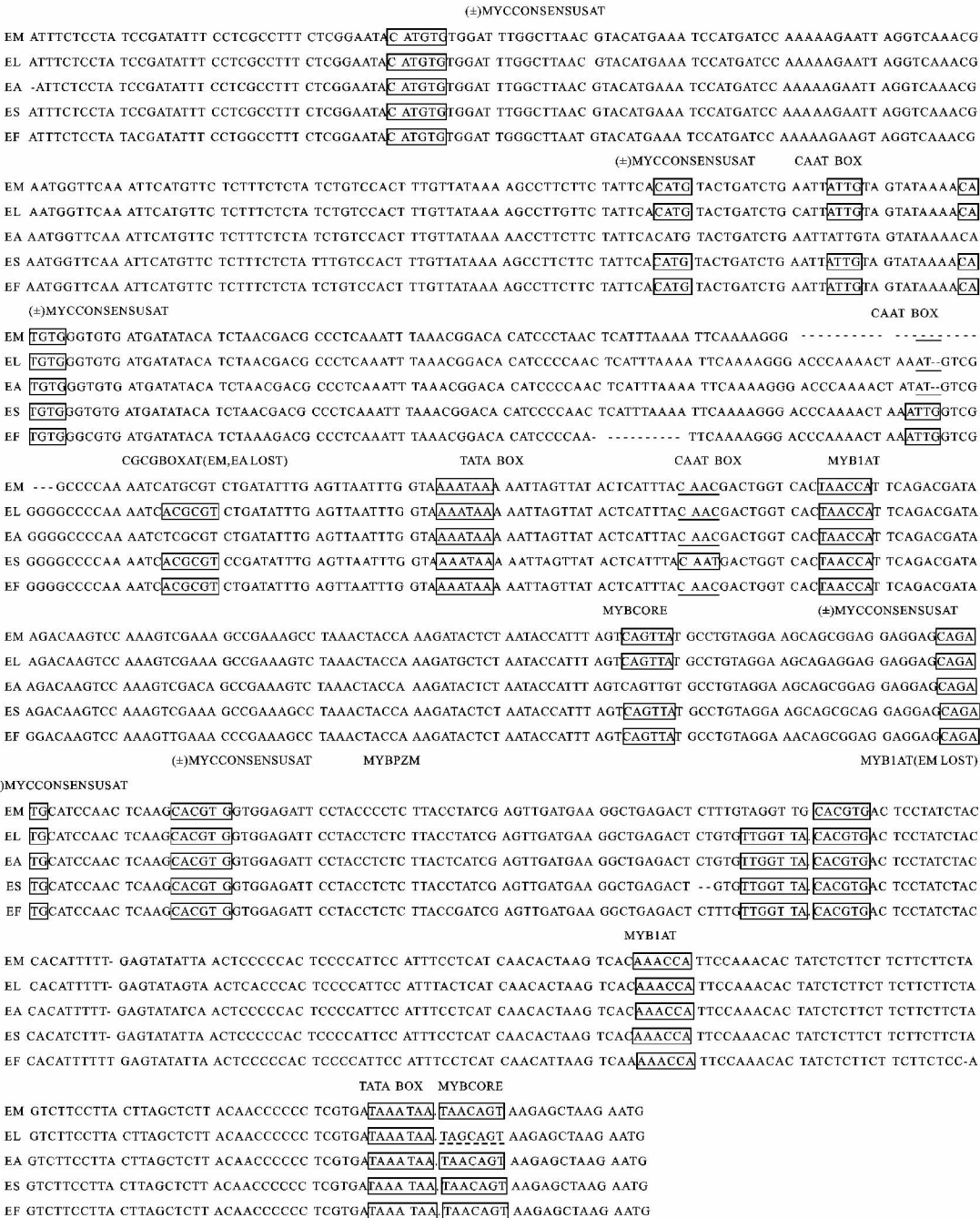


图 2 淫羊藿属 5 种植物 *CHS* 启动子序列。□: 转录因子结合位点; ---: 不显著变异; —: 显著变异; EM: 木鱼坪淫羊藿; ES: 箭叶淫羊藿; EF: 直距淫羊藿; EA: 粗毛淫羊藿; EL: 黔岭淫羊藿。

Fig. 2 Promoter sequences of *CHS* from five *Epimedium* species. □: Transcription factor recognition site; ---: Not significant mutation; —: Significant mutation; EM: *E. franchetii*; ES: *E. sagittatum*; EF: *E. mikinorii*; EA: *E. acuminatum*; EL: *E. leptorrhizum*.

由于序列的缺失和碱基的突变发生了不同程度的变化。在 *CHS* 起始密码子上游-750 bp 的范围内 MYB、MYC 两类转录因子的结合位点分别有 8 个和 11 个,其中 MYB 转录因子结合位点在两处发生了不显著的变异,1 处发生了显著性的变异,导致了 MYB1AT 转录因子结合位点的消失;而所有 MYC 转录因子结合位点均未发生变异。*ECHSP* 的核苷酸序列多态性较丰富($\theta = 0.02792$),转录因子结合位点较多。

2.3 查耳酮合成酶基因启动子区的比较

与其他物种相比,箭叶淫羊藿 (*E. sagittatum*)

CHS 启动子区域中调控类黄酮代谢途径的 MYB 和 MYC 转录因子结合位点数量最多(有 19 个),且较靠近起始密码子,第一个转录因子结合位点位于起始密码子上游-22 bp 处(表 1)。同为毛茛科的蓝色耬斗菜(*Aquilegia coerulea*) *CHS* 启动子区域中的这两类转录因子结合位点仅有 7 个,且第一个转录因子结合位点位于转录密码子上游-304 bp 处。此外大豆(*Glycine max*) *CHS* 启动子区域中的这两类转录因子结合位点总数有 17 个,且第一个转录因子结合位点位于转录密码子上游-15 bp 处,也较为突出。

表 1 不同物种的查耳酮合成酶基因启动子区分析

Table 1 Analysis of promoters of *CHS* from different species

植物 Species	长度 Length (bp)	结合位点总数 Total number of binding sites	第一个结合位点位置 Position of the first binding sites (bp)	序列来源 Origin of sequence
水稻 <i>Oryza sativa</i>	750	8	-179	http://www.plantgdb.org/OsGDB/
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	750	6	-116	http://www.plantgdb.org/VvGDB/
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	750	12	-49	http://www.plantgdb.org/AtGDB/
蒺藜苜蓿 <i>Medicago truncatula</i>	750	13	-88	http://www.phytozome.net/
二穗短柄草 <i>Brachypodium distachyon</i>	750	14	-90	http://www.phytozome.net/
粟 <i>Setaria italic</i>	750	11	-90	http://www.phytozome.net/
玉米 <i>Zea mays</i>	750	16	-173	http://www.phytozome.net/
高粱 <i>Sorghum bicolor</i>	750	16	-158	http://www.phytozome.net/
蓝色耬斗菜 <i>Aquilegia coerulea</i>	750	7	-304	http://www.phytozome.net/
番木瓜 <i>Carica papaya</i>	750	13	-88	http://www.phytozome.net/
黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	750	7	-153	http://www.phytozome.net/
大豆 <i>Glycine max</i>	750	17	-15	http://www.phytozome.net/
杨树 <i>Populus trichocarpa</i>	750	18	-70	http://www.phytozome.net/
木薯 <i>Manihot esculenta</i>	750	15	-29	http://www.phytozome.net/
箭叶淫羊藿 <i>Epimedium sagittatum</i>	750	19	-22	本研究 This paper

2.4 淫羊藿 *CHS* 启动子的进化分析

将 5 种淫羊藿植物的查耳酮合成酶基因启动子序列构建进化树(图 3),每个分支的 3 个数值分别为采用 NJ (Neighbor-Joining, 邻接法)、ME (Minimum Evolution, 最小进化法)、MP (Maximum parsimony, 最大简约法)法构建的进化树的自展支持率。3 种方法得到的进化树拓扑结构一致,因此合并在一起。这表明利用查耳酮合成酶基因启动子区可以较好地反映 5 种淫羊藿植物的进化关系(BP > 60%)。

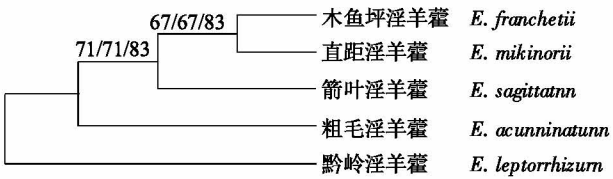


图 3 5 种淫羊藿的 *ECHSP* 的进化树。分支上的 3 个数值分别为用 NJ、ME 和 MP 法获得的自展支持率。

Fig. 3 The phylogenetic tree of *ECHSP* of five *Epimedium* species. Three values on branches indicate the bootstrap values based on NJ, ME and MP, respectively.

3 讨论

类黄酮代谢途径在高等植物中普遍存在,是目前研究最为深入、最为透彻的次生代谢途径之一。这一方面是由于类黄酮具有出众的生物学特性和研究价值,另一方面是生物技术的快速发展,特别是基因克隆技术的日新月异为其分子生物学研究奠定了基础。近年来对类黄酮代谢途径的调控机理进行了深入的研究^[11-13],关于类黄酮代谢途径的生物合成、调控及其运输等分子机制在模式植物金鱼草(*Antirrhinum majus*)、玉米(*Zea mays*)、矮牵牛(*Petunia hybrida*)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中已有报道^[14-15]。查耳酮合成酶基因 *CHS* 是类黄酮代谢途径的第一个结构基因,它的表达调控对整个代谢途径起着重要作用。本研究成功克隆了箭叶淫羊藿的 *CHS* 启动子,序列长度为 750 bp,它具有典型的真核生物启动子结构,有多种受光、紫外线、激素诱导的转录因子的结合位点(图 2)。对已获得的不同植物 *CHS* 基因起始密码子上游 750 bp 启动子区域的比较分析表明,它们皆具有调节类黄酮代谢转录因子的相关结合位点,但不同物种的数目和位置不一致(表 1)。另外,有研究表明淫羊藿的类黄酮含量可达 120 mg g⁻¹^[16],而同为毛茛科的蓝色耬斗菜的总类黄酮含量约为 10 mg g⁻¹^[17],大豆干燥种子的胚、萌发后的幼苗及子叶的主要次生代谢物都属于黄酮类物质^[18]。对转录因子结合位点数和第一个转录因子结合位点的位置进行分析表明,在以类黄酮作为主要次生代谢物的淫羊藿和大豆中,*CHS* 的启动子区域内与类黄酮代谢调控相关的转录因子的结合位点较多,且第一个转录因子结合位点出现的位置较靠近起始密码子;而蓝色耬斗菜的类黄酮含量较少,其 *CHS* 启动子区域转录因子结合位点数也较少,且第一个转录因子结合位点距起始密码子较远。这些说明植物体内类黄酮的含量可能与结构基因启动子区域内的转录因子的结合位点数和位置有关,其分子机理还有待进一步研究。

黄酮类物质是决定淫羊藿药效品质的重要指标,作为类黄酮代谢途径的第一个结构基因,*CHS* 表达调控对整个代谢途径起着至关重要的作用。研究表明,拟南芥的 *CHS* 的表达水平受到光、转录因子和启动子区域内的转录因子结合位点变异的综合调控^[11]。将从不同物种克隆得到的 *CHS* 启动子转化拟南芥原生质体后,并用不同因素进行诱

导,结果表明,*CHS* 的表达量提高了 75~204 倍^[19]。本研究克隆得到的淫羊藿 *CHS* 启动子区域有大量受光、紫外线、激素、干旱等诱导的转录因子的结合位点,因此对 *CHS* 启动子进行深入研究,尤其是外界环境对表达调控影响的分子机制进行研究,将为淫羊藿的品质改良奠定分子基础,并为淫羊藿的栽培条件选择提供重要的理论指导。类黄酮物质也是影响淫羊藿观赏价值的重要因素。从金鱼草中克隆得到的 *CHS* 启动子区序列,将其转入烟草(*Nicotiana tabacum*),结果表明其表达受紫外线的诱导调节,诱导依赖于内部特异序列的存在,且启动子的不同区域能调控不同器官和组织在不同时期 *CHS* 的表达^[20]。有研究表明,与组织特异表达和发育时期特异性表达相关的转录因子结合位点位于 TATA BOX 5'附近^[21]。淫羊藿叶片不仅在不同发育时期呈现不同颜色,而且一些物种中花器官的不同部位也呈现不同颜色,例如箭叶淫羊藿的外轮萼片呈紫色,内轮萼片为白色,花瓣为黄色。序列分析(图 1)表明,ECHSP 在 -19~-24 bp 处和 TATA BOX 5'附近的 -91~-97 bp 处均存在 MYBCORE 结合位点,这个位点可能与淫羊藿的 *CHS* 组织和发育特异性表达有关。有研究用抑制 *CHS* 表达的方法,已经在很多植物中成功地改变了花的颜色^[22-23]。本研究表明淫羊藿的 *CHS* 启动子区域的转录因子结合位点分布广泛,进一步对其表达调控机理进行研究,将为淫羊藿品种改良奠定分子基础。

查耳酮合成酶基因在已测序的模式物种中多为单拷贝或低拷贝基因,其启动子区域作为系统进化研究的分子手段受到人们的关注,如十字花科植物用查耳酮合成酶基因的启动子区域序列构建的进化树可以很好地解释物种间的系统进化关系^[19]。淫羊藿属植物的分类到目前为止还没有找到较好的分子标记,张明礼等用 ITS, *atpB-rbcL* 的间隔区对淫羊藿属植物的系统发育进行分析,但未获得理想的进化树^[24]。本研究结果表明,5 种淫羊藿属植物的查耳酮合成酶基因启动子区域的核苷酸多态性丰富,用 3 种不同方法构建的进化树的拓扑结构一致(图 3),这有可能为淫羊藿属植物的系统进化研究提供重要的分子标记。

参考文献

- [1] Song Y H, Li B S, Chen X M, et al. Bhanol extract from *Epimedium brevicornum* attenuates left ventricular dysfunction and cardiac remodeling through down-regulating matrix metalloproteinase-2

- and -9 activity and myocardial apoptosis in rats with congestive heart failure [J]. *Inter J Mol Med*, 2008, 21(1): 117–124.
- [2] Koes R, Verweij W, Quattrocchio F. Flavonoids: A colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways [J]. *Trend Plant Sci*, 2005, 10(5): 236–242.
- [3] Verhoeven M E, Bovy A, Collins G, et al. Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthetic pathway [J]. *J Exp Bot*, 2002, 53(377): 2099–2106.
- [4] Koes R, Spelt C, Mol J. The chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida* (V30): Differential, light-regulated expression during flower development and UV light induction [J]. *Plant Mol Biol*, 1989, 12(2): 213–225.
- [5] Weisshaar B, Armstrong G A, Block A, et al. Light-inducible and constitutively expressed dna-binding proteins recognizing a plant promoter element with functional relevance in light responsiveness [J]. *Embo J*, 1991, 10(7): 1777–1786.
- [6] Allen G C, Flores-Vergara M A, Krasnyanski S, et al. A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1 (5): 2320–2325.
- [7] Liu Y, Whittier R. Thermal asymmetric interlaced PCR: Automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking [J]. *Genomics*, 1995, 25(3): 674–681.
- [8] Michiels A, Tucker M, van den Ende W, et al. Chromosomal walking of flanking regions from short known sequences in GC-rich plant genomic DNA [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2003, 21 (3): 295–302.
- [9] Zeng S H, Xiao G, Guo J, et al. Development of a EST dataset and characterization of EST-SSRs in a traditional Chinese medicinal plant, *Epimedium sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim [EB/OL]. *BMC Genom*, 2010, 11: 94, <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/94>
- [10] Ramsay N A, Glover B J. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity [J]. *Trend Plant Sci*, 2005, 10 (2): 63–70.
- [11] Broun P. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: A complex network of conserved regulators involved in multiple aspects of differentiation in *Arabidopsis* [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8(3): 272–279.
- [12] Kim S, Baek D, Cho D, et al. Identification of two novel inactive *DFR-A* alleles responsible for failure to produce anthocyanin and development of a simple PCR-based molecular marker for bulb color selection in onion (*Allium cepa* L.) [J]. *Theor Appl Gen*, 2009, 118(7): 1391–1399.
- [13] Chiu L W, Zhou X J, Burke S, et al. The purple cauliflower arises from activation of a *MYB* transcription factor [J]. *Plant Physiol*, 2010, 154(3): 1470–1480.
- [14] Winkel-Shirley B. It takes a garden. How work on diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid metabolism [J]. *Plant Physiol*, 2001, 127(4): 1399–1404.
- [15] Lepiniec L, Debeaujon I, Routaboul J M, et al. Genetics and biochemistry of seed flavonoids [J]. *Ann Rev Plant Biol*, 2006, 57: 405–430.
- [16] Liu C M, Zhao X L, Liu Z Q, et al. Isolation and extraction of total flavonoids from *Epimedium koreanum* Nakai by supercritical fluid extraction [J]. *Chem Res Chin Univ*, 2004, 20(6): 707–710.
- [17] Bylka W. Flavonoids in the leaves with stems of some species of the *Aquilegia* L. genus [J]. *Acta Polon Pharmac*, 2002, 59 (1): 57–60.
- [18] Graham T L. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates [J]. *Plant Physiol*, 1991, 95(2): 594–603.
- [19] Koch M A, Weisshaar B, Kroymann J, et al. Comparative genomics and regulatory evolution: Conservation and function of the *CHS* and *Apeta3* promoters [J]. *Mol Biol Evolut*, 2001, 18 (10): 1882–1891.
- [20] Fritze K, Staiger D, Czaja I, et al. Developmental and UV-light regulation of the snapdragon chalcone synthase promoter [J]. *Plant Cell*, 1991, 3(9): 893–905.
- [21] Chen Z L, Pan N S, Beachy R N. A DNA-sequence element that confers seed-specific enhancement to a constitutive promoter [J]. *Embo J*, 1988, 7(2): 297–302.
- [22] Mol J, Cornish E, Mason J, et al. Novel coloured flowers [J]. *Curr Opin Biotechn*, 1999, 10(2): 198–201.
- [23] Forkmann G, Martens S. Metabolic engineering and applications of flavonoids [J]. *Curr Opin Biotechn*, 2001, 12(2): 155–160.
- [24] Zhang M L, Uhink C H, Kadereit J W. Phylogeny and biogeography of *Epimedium/Vancouveria* (Berberidaceae): Western North American-East Asian disjunctions, the origin of European mountain plant taxa, and East Asian species diversity [J]. *Syst Bot*, 2007, 32(1): 81–92.