

天山雪莲 UDP 葡萄糖-类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶基因的克隆及功能分析

唐亚萍, 原慧, 覃建兵

新疆师范大学分子生物学与生物信息研究室, 新疆 乌鲁木齐 830053

唐亚萍, 原慧, 覃建兵. 天山雪莲 UDP 葡萄糖-类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶基因的克隆及功能分析. 生物工程学报, 2012, 28(6): 705-714.

Yaping Tang, Hui Yuan, Jianbing Qin. Identification and characterization of a flavonoid-3-O-glucosyltransferase gene from *Saussurea involucrata*. Chin J Biotech, 2012, 28(6): 705-714.

摘 要: UDP 葡萄糖-类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶 (Flavonoid-3-O-glucosyltransferase, 3GT) 是植物重要的次生代谢产物生物合成途径中的关键酶。文中采用现代生物信息手段, 经 3GT 的同源比对后设计基因特异引物, 运用 RT-PCR 及 RACE 技术从天山雪莲 *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. 叶片中克隆得到 3GT 基因的全长序列 (GenBank Accession No. JN092127)。3GT 基因的 cDNA 全长序列含有 1 个 1 548 bp 的开放阅读框 (ORF), 编码 516 个氨基酸, 该基因推断的蛋白与草莓 GT6 蛋白的相似性为 91%, 与毛杨梅 3GT 的相似性为 89%; 经序氨基酸序列比对, 推断的天山雪莲 3GT 具有糖基转移酶基因家族特有的结构域 PSPG-box。半定量 PCR 的结果显示, 天山雪莲 3GT 基因在叶及愈伤组织中表达量最高, 在根中有少量表达, 茎中不表达。将该基因构建到含有 35S 启动子的植物表达载体上, 利用农杆菌介导的遗传转化法进行同源转化, 将筛选到的含有转 3GT 基因的愈伤组织进行悬浮培养, 并用紫外分光光度法测量其黄酮含量是非转基因愈伤组织总黄酮平均值的 2.06 倍。

关键词: 天山雪莲, 3GT, cDNA 克隆, 同源转化

Received: November 11, 2011; **Accepted:** January 10, 2012

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 30960092, 30960044).

Corresponding author: Jianbing Qin. Tel: +86-991-4332469; E-mail: jianbingqin@xjnu.edu.cn

国家自然科学基金(Nos. 30960092, 30960044)资助。

Identification and characterization of a flavonoid-3-O-glucosyltransferase gene from *Saussurea involucrata*

Yaping Tang, Hui Yuan, and Jianbing Qin

Research Group of Molecular Biology and Informatics, Xinjiang Normal University, Urumqi 830053, Xinjiang, China

Abstract: The flavonoid-3-O-glucosyltransferase (3GT) is one of the most important enzymes for biosynthesis of plant secondary metabolites. In this paper, the homology analysis and gene special primers design were used. With the methods of modern molecular biology, the full-length gene of 3GT (GenBank Accession No. JN092127) which was cloned from *Saussurea involucrata* Kar. et Kir by RT-PCR and RACE. The cDNA sequence of 3GT consisted of 1548 bp open reading frame (ORF) encoding 516 amino acid, the deduced 3GT protein shared 91% and 89% identities with that of *Fragaria x ananassa* GT6, *Manihot esculenta* anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase. Homology analysis showed that deduced 3GT protein has a glycosyltransferase signature domain PSPG-box. The transcripts of 3GT members were found mainly in leaves and callus. 3GT gene of *S. involucrata* was under the control of the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter, homologous transformation used an *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation system. The results on UV spectrophotometry showed *S. involucrata* callus after suspension culture that an average of total flavonoids on transgenic callus was 2.06 times higher than non-transgenic callus.

Keywords: *Saussurea involucrata*, flavonoid-3-O-glucosyltransferase gene, cDNA clone, homoiosis

黄酮类化合物是植物次生代谢过程中主要的产物之一，在植物的生理和形态学方面发挥着各种各样的功能。黄酮类化合物能够帮助植物抗紫外线、抵抗病原微生物的侵害、抗虫害并在植物生殖过程中担当信使^[1]。黄酮类化合物也是人类和动物的重要营养物质之一，尤其在人类的营养和医药方面，黄酮类化合物具有抗辐射、抗氧化、抗癌及心血管疾病等方面发挥着重要的作用。

糖基转移酶广泛存在于植物中，催化植物次生代谢产物的合成，是植物次生代谢过程中的重要部分，是天山雪莲药用化学成分花青素的生物合成的关键酶。UDP 葡萄糖-类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶 (3GT) 催化 UDP 葡萄糖的糖基取代花色素的 3-OH 集团，催化不稳定的花色素糖苷形成各种稳定的花色苷^[2]，对花色素进行糖基化修饰，以增加其稳定性和水溶性。Kho 等^[3]1978 年

首次对 3GT 基因的遗传调控和酶活性进行报道，3GT 基因是 1984 年采用转座子标签技术从玉米中分离而来^[4]，随后控制 3GT 基因活性的遗传位点 An1、An2 和 An3 也在矮牵牛中被分离出来^[5]。

天山雪莲为新疆特有的珍惜名贵中药，为国家三级保护渐危植物^[6]，特殊的生长环境造就了其独特的药用价值。黄酮类化合物是天山雪莲的主要药用成分，在水母雪莲 *Saussurea medusa*、天山雪莲 *Saussurea involucrata* 和雪兔子 *Saussurea gossypiphora* 野生植株中，天山雪莲总黄酮的抗氧化活性最高^[7]。天山雪莲花青素属黄酮类化合物，具有抗氧化、抗辐射、抗癌等作用。由于人类对天山雪莲自然资源的掠夺性开采，使得该物种濒临灭绝，目前有关天山雪莲分子生物学的研究较少。本研究从天山雪莲中克隆了 3GT 基因，运用生物信息软件对 3GT 基因的蛋白质序

列进行分析,构建了该蛋白的系统进化树,通过农杆菌介导的同源转化,经筛选得到转基因天山雪莲愈伤组织,其总黄酮含量明显高于非转基因的愈伤组织。初步鉴定了天山雪莲 3GT 基因在黄酮代谢途径中的作用,为提高天山雪莲中药用化学成分黄酮类物质及实现天山雪莲花青素的人工生物合成的研究奠定基础,为解决天山雪莲资源匮乏提供参考。

1 材料与方法

1.1 天山雪莲材料及实验试剂

野生天山雪莲种子采集于天山“一号冰川”,挑选籽粒饱满的种子 50 粒,经灭菌后接入 1/2 MS 培养基内^[8],待种子发芽长出真叶 4~5 片后使用。

大肠杆菌 DH5 α 感受态、LA *Taq* 酶、3'-Full RACE Core Set Ver.2.0、限制性内切酶 (TaKaRa 公司); TRIzol 试剂、PCR 2.1 vector、PCR Super Mix、T4 DNA 连接酶 (Invitrogen 公司); RevertAid First Stand cDNA Synthesis Kit (Fermentas 公司); SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Clontech 公司); 乙酰丁香酮 (Sigma 公司); 潮霉素 B (Roche Diagnostics GmbH, Germany)。

1.2 天山雪莲总 RNA 提取及 cDNA 第一链合成

采用液氮研磨法用 TRIzol 试剂提取天山雪莲叶片、茎、根及愈伤组织总 RNA。按照 RevertAid First Stand cDNA Synthesis Kit 说明书合成 cDNA 第一链。按照 SMARTer RACE cDNA Amplification Kit 及 3'-Full RACE Core Set Ver.2.0 试剂盒说明书合成 5'端及 3'端完整的天山

雪莲叶片 cDNA 第一链。

1.3 天山雪莲 cDNA 片段的同源克隆

根据 3GT 基因的同源序列利用 Primer5.0 及 Oligo6.0 设计基因特异引物 FGT 和 RGT (表 1),以 cDNA 第一链为模板扩增天山雪莲 3GT 基因的保守区域,反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。扩增的 PCR 产物经 Axygen 的凝胶回收试剂盒回收目的条带后连接到 PCR2.1 载体中,经酶切鉴定送华大基因有限公司测序。

1.4 天山雪莲 3GT 基因的 3' RACE 和 5' RACE

根据测序获得的 cDNA 片段,用生物信息软件设计基因特异引物 (表 1),以 cDNA 第一链为模板,3' RACE outer Primer、3' RACE inner Primer、GTF1 和 GTF2 为引物,进行 Nested PCR,反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 65 °C ~50 °C

表 1 文中所用引物序列

Table 1 Primer used in this study

Primers	Sequences (5'-3')
FGT	CACTGTGGTTGGAACCTCGGTGTTGGAG
RGT	TTTGAAATCATCCTTCAAACTGTAAA
3' RACE GTF1	CATGGGCTCCAACACCGAGTTCCAACC
3' RACE GTF2	TCCAACACCGAGTTCCAACCACAGTG
5' RACE GTR1	CACTGTGGTTGGAACCTCGGTGTTGGAG
5' RACE GTR2	TGCTGGTGATTGAGTTGTAAGTACTAG
FLGTF	GAAGATCTTCTACATGGGGAGTGCAG
FLGTR	CGGCTAGCCGTTCTAGCCCCAAT
hptF	AGCTGCGCCGATGGTTTCTACAA
hptR	ATCGCCTCGCTCCAGTCAATG

30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环 (每个循环降低 0.5 °C); 72 °C 延伸 10 min。5' RACE 以 *GTR1* 和 *GTR2* 为引物, 按照 SMARTer RACE cDNA Amplification Kit 说明书进行 PCR 扩增, 反应条件与 3' RACE 反应条件相同。扩增产物经连接转化, PCR 及酶切鉴定后测序。

1.5 cDNA 全长扩增

依据 cDNA 拼接序列, 以基因特异引物 *FLGTF* 和 *FLGTR*, 引物中划线部分为 *Bgl* II 和 *Nhe* I 酶切位点, 对 cDNA 序列进行全长扩增, 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 并对扩增产物测序。

1.6 天山雪莲 3GT 基因 cDNA 序列及其编码蛋白氨基酸的序列分析

在 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) 和 DNAMAN 中进行基因序列的同源比较, 在 NCBI 中的 ORF Finding 进行开放阅读框的预测, 用软件 DNAMEN 对基因 cDNA 进行核苷酸序列分析, 在网站 Clustal W2 (www.ebi.ac.uk/clustalw/) 进行氨基酸序列的同源序列比对并构建系统进化树。

1.7 3GT 基因的转录模式

用 3GT 基因的全长引物及用软件 Primer5.0 及 Oligo6.0 设计, 对 3GT 基因组织器官表达模式进行分析。内参基因为 β -actin 基因特异引物。

1.8 3GT 基因的表达载体的构建及农杆菌转化

将已获得的 3GT 基因全长及表达载体 pCAMBIA1305.1 同时用内切酶 *Bgl* II 和 *Nhe* I 在

恒温水浴锅中 37 °C 双酶切 2 h 以上。酶切产物经回收纯化后连接转化入大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α , 提取大肠杆菌质粒, 筛选阳性克隆, 用电击转化法转化进入根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 菌株 EHA105 中, 用 3GT 全长基因特异引物进行 PCR 检测转化的农杆菌菌株, 将检测到的菌株命名为 pS3GT。

1.9 3GT 基因叶盘转化及转基因愈伤组织的筛选

天山雪莲叶片切成 0.5 cm×0.5 cm 大小的叶盘, 将该叶盘置于天山雪莲愈伤组织诱导培养基中暗培养 2 d, 叶盘浸泡在含有 pS3GT 菌株及 100 μ mol/L 乙酰丁香酮, OD_{600} =0.5 的 MS 液体培养基中 10 min^[9-10]。将共培养 2 d 的叶盘转入含有 8 mg/L 潮霉素 (Hygromycin, hyg) 的天山雪莲愈伤组织诱导培养基内进行转基因愈伤组织的筛选^[11], 45 d 后, 提取在抗性培养基上生长的愈伤组织的 DNA, 用潮霉素基因的特异引物 *hptF* 和 *hptR* (表 1) 进行转基因愈伤组织的筛选。

1.10 转基因愈伤组织的悬浮培养及紫外分光光度法测量总黄酮

将筛选到的转 3GT 基因的愈伤组织及非转基因愈伤组织各 0.2 g 分别接入 10 mL 的 N6 液体培养基内进行悬浮培养^[12], 光周期为 12 h, 转速 110 r/min, 培养温度为 25 °C。分别培养 4、8、12、16 d, 试验重复 3 次。将培养的愈伤组织在 60 °C 烘箱内烘干, 测量干重, 并用 80% 乙醇, 60 °C 浸泡过夜提取总黄酮, 用紫外分光光度法测定^[12], 波长为 510 nm, 其芦丁标准品与其吸光度的直线方程: $C=0.09344A-0.00230797$, $r=0.9992$ (C 为总黄酮含量单位是 g/L, A 为光的吸收变量), 并测量雪莲愈伤组织的总黄酮量。

2 结果与分析

2.1 天山雪莲 UDP 葡萄糖-类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶基因 cDNA 片段的分析

根据双子叶植物 3GT 基因同源序列,运用生物信息软件设计的天山雪莲 3GT 基因特异引物进行扩增,纯化此扩增产物并进行测序,结果获得 1 个 327 bp 的 cDNA 片段(图 1)经生物信息软件 DNAMAN、Clustal W2 及 Blast 分析发现该片段与菊科向日葵属植物的葡萄糖苷转移酶基因 UGT90A7 (GenBank Accession No. EU561019) 高度同源,相似性达到 100%,与鸢尾属植物的 3GT (GenBank Accession No. AB161175) 基因相似性为 88%,表明实验获得的 cDNA 片段为目的基因类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶基因片段。

2.2 天山雪莲 UDP 葡萄糖-类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶基因全长 cDNA 的克隆与序列分析

依据天山雪莲中该基因 cDNA 片段的核苷酸序列设计特异引物,用 RACE 技术克隆目的基因的 3' 和 5' cDNA 末端序列进行,测序结果表明,其大小分别为 570 bp 和 1 190 bp (图 1)。

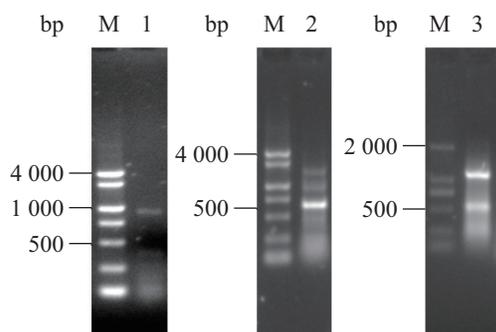


图 1 3GT 基因特异引物 RT-PCR、3' RACE 及 5' RACE 扩增

Fig. 1 PCR products of RT-PCR, 3' RACE and 5' RACE. M: DNA marker; 1: product of primers FGT and RGT; 2: product of 3GT 3' RACE; 3: product of 3GT 5' RACE.

对已获得的 3 个 cDNA 片段进行序列拼接,结果获得了 1 个全长为 1 721 bp 的 cDNA 序列。在该 cDNA 序列两端设计基因特异引物,进行 PCR 扩增、测序,得到 1 个大小为 1 698 bp 的 cDNA 片段,将此 1 698 bp 片段与目的基因的 cDNA 拼接序列进行比对分析,分析结果显示两序列一致,这表明天山雪莲 3GT 基因 cDNA 拼接序列正确。天山雪莲 3GT 基因全长含有 1 548 bp 的开放阅读框,其 5' 含有起始密码子 ATG, 3' 端含有 137 bp 的非编码区,这表明天山雪莲 3GT 基因的 cDNA 序列完整,获得 GenBank 登录号 (Accession No. JN092127)。

2.3 天山雪莲 3GT 氨基酸序列分析

根据天山雪莲 3GT 基因 cDNA 全长序列推测其编码 516 个氨基酸残基。以来自不同物种的 5 种类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶氨基酸序列进行序列比对分析,推测天山雪莲类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶含有一个由 44 个氨基酸残基构成的糖基转移酶的保守域 PSPG^[13],如图 2 中划线部分,该保守序列被认为是结合糖基供体的区域。这表明,从天山雪莲中克隆得到的基因 3GT 具有类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶基因家族所具有的特征,进一步证明其为类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶基因。

2.4 天山雪莲 3GT 系统进化树分析

天山雪莲类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶与其他植物的 GT 氨基酸序列的系统进化分析表明(图 3),不同物种的类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶聚为一类,天山雪莲类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶与毛杨梅的 3GT 基因及草莓的 GT6 亲缘关系较

近, Griesser 等^[14]运用原核表达, 在体外获得草莓 GT6 表达的蛋白, 对该蛋白的分析表明, 该蛋白参与类黄酮的糖基化。

2.5 天山雪莲 3GT 基因的转录模式分析

根据利用 3GT 基因的保守引物扩增不同组织中的基因 cDNA 片段。从图 4 中可以看出, 天山雪莲 3GT 基因在叶和愈伤组织中的表达量比较高, 在根中仅有少量的表达, 在茎中几乎不表达。

2.6 天山雪莲 3GT 基因的表达载体构建及农杆菌转化

重组质粒构建 (图 5), 挑取大肠杆菌中的单菌落用 *Bgl* II 和 *Nhe* I 双酶切重组质粒, 得到预期大小 1 808 bp 的片段, 并用 3GT 基因特异引物进行 PCR 检测得到预期 1 808 bp 的片段。经电击转化的农杆菌转化子的筛选与大肠杆菌重组子的筛选相同, 均得到预期大小的片段。

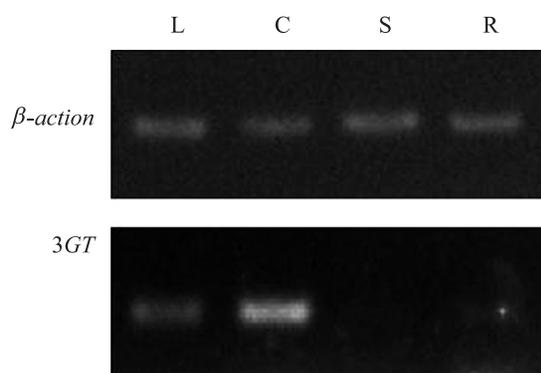


图 4 天山雪莲 3GT 基因在不同组织中的转录模式
Fig. 4 Transcriptional pattern analysis of 3GT in different organs of *S. involucrata*. Transcripts were amplified using gene specific primers, with the PCR products separated using 1% agarose gel. Equal cycles for PCR reaction, different loadings for the different samples. L: leaf; C: callus; S: stem; R: root.

2.7 天山雪莲转 3GT 基因愈伤组织的筛选

经农杆菌侵染的雪莲叶片共 150 片, 转入含有潮霉素的转基因愈伤组织筛选培养基内培养 20 d 后开始出愈, 经 45 d 培养后, 运用 CTAB 法提取雪莲愈伤组织的总 DNA。由于该遗传转化为同源转化, 所以对转化子的筛选采用抗性标记基因的 PCR 检测, 用潮霉素基因的特异引物进行转化子的筛选, 共检测到 14 个转化子 (图 6), 该基因的转化率为 9.33%。

2.8 转天山雪莲 3GT 基因的愈伤组织干重及总黄酮含量

取其中 3 个转化子进行雪莲愈伤组织的悬浮培养, 分别测量其在 4、8、12、16 d 的平均干重

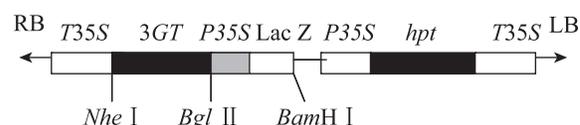


图 5 3GT 表达载体的构建

Fig. 5 Plasmid used in transformation of 3GT transgenic. *P35S*: CaMV 35S promoter; *T35S*: CaMV 35S terminator; *3GT*: *S. involucrata* UDP-glucose gene; *hpt*: hygromycin phosphotransferase gene.

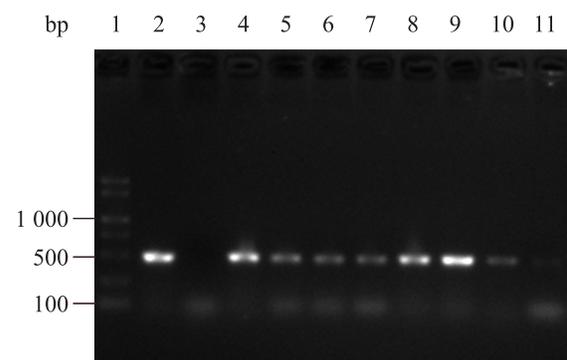


图 6 3GT 基因转基因愈伤组织的检测

Fig. 6 PCR analysis of transgenes in *S. involucrata* callus, *hpt* gene. 1: DNA marker; 2: positive control; 3: negative control; 4–11: *S. involucrata* callus PCR.

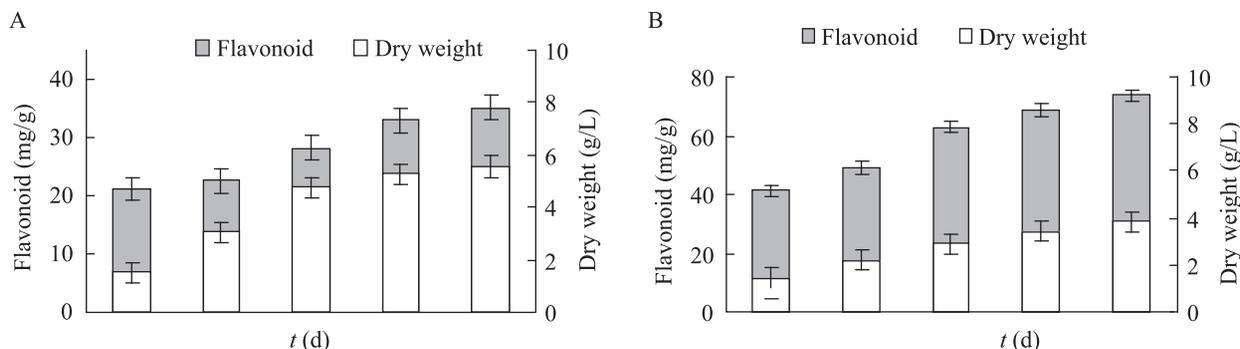


图7 悬浮培养雪莲愈伤组织干重及总黄酮含量

Fig. 7 Dry weight and flavonoid content in *S. involucrata* callus after suspension culture. (A) The control of the *S. involucrata* callus. (B) 3GT gene transformed of *S. involucrata* callus.

及总黄酮含量的变化如图7所示,随着悬浮培养时间的增加,雪莲愈伤组织的干重和总黄酮含量不断增加,在第12天左右干重及总黄酮含量的增加幅度开始变小(图7);其中转基因愈伤组织的总黄酮含量是非转基因愈伤组织总黄酮含量平均值的2.06倍。

3 讨论

尽管花青素代谢途径中的多个结构基因已经从水母雪莲中分离出来^[15-17],但是国内外未见报道天山雪莲中花青素代谢途径的关键酶基因3GT的研究,该文首次从天山雪莲中克隆得到3GT基因。本研究通过同源克隆的方法从天山雪莲叶片中分离得到3GT基因全长序列,根据推测的蛋白质序列分析基因的功能,运用同源转化的方法验证了转基因雪莲愈伤组织中的总黄酮含量比对照有显著提高,这一结果与王庆菊等^[18]在对紫叶稠李叶片和张剑亮等^[19]在向日葵的研究3GT基因的过表达能够显著提高植物中黄酮类物质的积累这一研究结果一致。

近几年国内外研究学者对糖苷代谢的研究

不断深入。花青素糖基转移酶(GT)对于植物花色和花青素的稳定性及可溶性很重要,是因为其决定了糖基化的位置。植物的次生代谢过程中糖基转移酶具有很严格的糖附属物的选择性^[20]。多数花青素的糖基化是通过葡萄糖转移酶类的3GT实现的。目前研究报道的植物GTs多为将底物通过C-或者N-糖基化形成稳定的代谢产物。天山雪莲的3GT与其他物种的3GT在C端具有相似性,能够识别相同或相似的受体,而N端的相似性远远低于C端,说明天山雪莲花青素的糖基化可能主要为C-糖基化。天山雪莲3GT和各种植物糖基转移酶的进化树表明,天山雪莲3GT与不同物种的3GT亲缘关系较近,与毛杨梅的3GT相似性较高。

3GT基因的表达具有品种和时间特异性,3GT基因仅在红皮葡萄品种*Vitis vinifera*中表达^[21],在龙胆*Gentiana triflora*中,只能在花瓣中检测到3GT基因的表达,在白色花中很少表达^[22]。当3GT基因被抑制表达时,组织培养的葡萄细胞中花色苷的含量明显降低^[23]。天山雪莲3GT基因在叶及愈伤组织中表达量最高,在根中

表达量较少,在茎中几乎不表达,对该方面具体机理还有待进一步研究。

目前,在 GTs 家族中还有 95% 的基因及蛋白还不知道其功能和特征,这就为研究学者们提出了极大的挑战。对天山雪莲 3GT 基因功能的初步研究中,转基因愈伤组织中总黄酮的含量较野生天山雪莲总苞高 2.47 倍,天山雪莲 3GT 是雪莲黄酮代谢途径中的一个关键酶,能够促进黄酮类物质在天山雪莲细胞内的积累,这与前人的研究结果一致,因此,该基因在雪莲总黄酮合成过程中起着重要的作用。运用基因工程手段将天山雪莲自身的 3GT 基因转化进入天山雪莲愈伤组织中能够提高天山雪莲总黄酮的合成能力,这将为今后对实现天山雪莲黄酮类物质的人工合成方面的研究奠定基础,是解决天山雪莲资源匮乏的有效方法之一。

REFERENCES

- [1] Parr AJ, Bolwell GP. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J Sci Food Agric*, 2000, 80(7): 985–1012.
- [2] Castellarin SD, Matthews MA, Gaspero GD, et al. Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries. *Planta*, 2007, 227(1): 101–112.
- [3] Kho KFF, Kamsteeg J, Brederode JV. Identification, properties and genetic control of UDG-glucose cyandin-3-O-glucosyltransferase in *Petunia hybrida*. *Z Pflanzen Physiol*, 1978, 88: 449–464.
- [4] Fedoroff NV, Furtak DB, Nelson OE Jr. Cloning of the *bronze* locus in maize by a simple and generalizable procedure using the transposable controlling element *Activator (Ac)*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81(12): 3825–3829.
- [5] Gerats AGM, Wallroth M, Donker-Koopman W, et al. The genetic control of the enzyme UDP-glucose: 3-O-flavonoid-glucosyltransferase in flowers of *Petunia hybrida*. *Theor Appl Genet*, 1983, 65(4): 349–352.
- [6] Qi XL, Jiang SG, Lü XF, et al. Effects of phytohormones on plant regeneration and production of flavonoids in transgenic *Saussurea involucreta* hairy roots. *Chin J Biotech*, 2011, 27(1): 69–75.
乔献丽, 蒋曙光, 吕晓芬, 等. 激素对转基因雪莲毛状跟植株再生及类黄酮产生的影响. *生物工程学报*, 2011, 27(1): 69–75.
- [7] Qiu J, Xue XF, Chen FD, et al. Quality evaluation of snow lotus (*Saussurea*): quantitative chemical analysis and antioxidant activity assessment. *Plant Cell Rep*, 2010, 29(12): 1325–1337.
- [8] Pang HX, Zhu CQ, Qin JB. Effects of different temperature, culture media and osmotic potentials on seeds germination of *Saussurea involucreta*. *Seed*, 2009, 28(10): 76–79.
庞红霞, 祝长青, 覃建兵. 温度、培养基成分和渗透势对新疆雪莲种子萌发的影响. *种子*, 2009, 28(10): 76–79.
- [9] Guan YY, Ren GD, Guo XY, et al. Establishment of agrobacterium-mediated transformation system in *Saussurea involucreta*. *Acta Agric Bor-Occident Sin*, 2010, 19(7): 84–88.
管岩岩, 任国栋, 郭新勇, 等. 天山雪莲遗传转化体系建立. *西北林业学报*, 2010, 19(7): 84–88.
- [10] Cheng LM, Cao QF, Huang J, et al. Establishment of highly-efficient genetic transformation system in *Cichorium intybus*. *Acta Pratacul Sin*, 2004, 13(6): 112–116.
程林梅, 曹秋芬, 黄静, 等. 菊苣高效遗传转化体系的建立. *草业学报*, 2004, 13(6): 112–116.
- [11] Tang YP, Qin JB, Yuan H. Study on the sensitivity of *Saussurea involucreta* to hygromycin during tissue culture. *Seed*, 2011, 30(9): 11–13.
唐亚萍, 覃建兵, 原慧. 雪莲组培过程对潮霉素

- 敏感性的研究. 种子, 2011, 30(9): 11-13.
- [12] Wu LQ, Guo SX, Xiao PG. Cell suspension culture and flavonoids production in *Saussurea involucrate*. Chin J Chin Mater Med, 2007, 30(13): 965-968.
武利勤, 郭顺星, 肖培根. 新疆雪莲细胞悬浮系的建立和黄酮类活性成分的产生. 中国中药杂志, 2007, 30(13): 965-968.
- [13] Hughes J, Hughes MA. Multiple secondary plant product UDP-glucose glucosyltransferase genes expressed in cassava (*Manihot esculenta Crantz*) cotyledons. Mitochondrial DNA, 1994, 5(1): 41-49.
- [14] Griesser M, Vitzthum F, Fink B, et al. Multi-substrate flavonol *O*-glucosyltransferases from strawberry (*Fragaria×ananassa*) achene and receptacle. J Exp Bot, 2008, 59(10): 2611-2625.
- [15] Jin ZP, Grotewold E, Qu WQ, et al. Cloning and characterization of a flavanone 3-hydroxylase gene from *Saussurea medusa*. DNA Seq, 2005, 16(2): 121-129.
- [16] Li FX, Jin ZP, Qu WQ, et al. Cloning of a cDNA encoding the *Saussurea medusa* chalcone isomerase and its expression in transgenic tobacco. Plant Physiol Biochem, 2006, 44(7/9): 455-461.
- [17] Cheng LQ, Xu YJ, Grotewold E, et al. Characterization of anthocyanidin synthase (ANS) gene and anthocyanidin in rare medicinal plant-*Saussurea medusa*. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2007, 89(1): 63-73.
- [18] Wang QJ, Li XL, Wang L, et al. Dynamic changes of anthocyanin and the relevant biosynthesis enzymes in *Padus virginiana* 'Schubert' leaves. Sci Sil Sin, 2008, 44(3): 45-49.
王庆菊, 李晓磊, 王磊, 等. 紫叶稠李叶片花色苷及其合成相关酶动态. 林业科学, 2008, 44(3): 45-49.
- [19] Zhang JL, Pan DR, Zhou YF, et al. Cloning and expression of genes involved in anthocyanins synthesis in *Ornamental* sunflower. Acta Hort Sin, 2009, 36(1): 73-80.
张剑亮, 潘大仁, 周以飞, 等. 观赏向日葵花青素苷合成途径同源基因的克隆与表达. 园艺学报, 2009, 36(1): 73-80.
- [20] Kramer CM, Prata RTN, Willits MG, et al. Cloning and regiospecificity studies of two flavonoid glucosyltransferases from *Allium cepa*. Phytochemistry, 2003, 64(6): 1069-1076.
- [21] Kobayashi S, Ishimaru M, Ding CK, et al. Comparison of UDP-glucose: flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase (UFGT) gene sequences between white grapes (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin. Plant Sci, 2001, 160(3): 543-550.
- [22] Nakatsuka T, Nishihara M, Mishiba K, et al. Two different mutations are involved in the formation of white-flowered gentian plants. Plant Sci, 2005, 169(5): 949-958.
- [23] Afifi M, El-kdreamy A, Legrand V, et al. Control of anthocyanin biosynthesis pathway gene expression by eutypine, a toxin from *Eutypa lata*, in grape cell tissue cultures. J Plant Physiol, 2003, 160(8): 971-975.