大豆四粒荚突变体子房转录组分析

龚招阳¹,马博涵¹,李泽远¹,焦苏淇¹,张 君²,姚 丹¹*,刘洪霞³* (1. 吉林农业大学生命科学学院,长春 130118;2. 吉林农业大学农学院,长春 130118;3.吉林省农业科学院,长春 130033)

摘 要:本研究首次以大豆四粒荚突变体为材料,采用Illumina/Solexa技术对未授粉子房进行转录组测序分析。结果显示:测序共获得55 582个表达基因和2 060个差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),其中上调DEGs 1 381个,下调DEGs 679个,log2 ratio 值大于10的DEGs 75个。GO和KEGG差异显著富集分析显示,差异基因几乎参与了如糖、脂肪、氨基酸、激素等所有主要物质的代谢、转录、翻译及信号转导等过程。该测序结果将为四粒荚相关基因的克隆及分子调控机理研究奠定基础,同时也对今后采用分子生物学手段培育优良大豆新品种具有重要理论意义。 关键词:大豆;四粒荚;未授粉子房;转录组

中图分类号: \$565.1 文献标识码: A

文章编号:2096-5877(2020)01-0029-06

Transcriptome Analysis of Ovary in Soybean Four-pod Mutants

GONG Zhaoyang¹, MA Bohan¹, LI Zeyuan¹, JIAO Suqi¹, ZHANG Jun², YAO Dan¹*, LIU Hongxia³*

(1. College of life Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118; 2. College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118; 3. Jilin Acadamy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: In this study, four-pod mutants of soybean were used as materials for the first time to sequence and analyze the transcriptome of unpollinated ovary with Illumina/Solexa technology. The results showed that 55 582 genes and 2 060 differentially expressed genes (DEGs) were obtained by sequencing, of which 1 381 were up regulated and 75 were DEGs with log2 ratio greater than 10. The analysis of significant enrichment of GO and KEGG showed that the differential genes were almost involved in the metabolism, transcription, translation and signal transduction of all major substances, such as sugar, fat, amino acids and hormones. The sequencing results will lay a foundation for the cloning of four-pod related genes and the study of molecular regulation mechanism, and also have important theoretical significance for the cultivation of new soybean varieties by molecular biological means in the future. Key words: Soybean; Four-pod; Unpollinated ovary; Transcriptome

依赖于新一代测序手段基于整个转录组水平 的测序技术(RNA-seq)是在全基因组水平研究基 因表达和进行基因功能预测的一种方便、快捷和 高效的研究技术^{III}。即使在没有测序参考基因组 的条件下,也可以利用 RNA-seq 对基因表达进行 深入研究。因此,RNA-seq 已经成为目前解析基 因组功能原件和揭示细胞或组织分子构成的一种 最为有效的手段。近年来,包括大豆在内的五种 主要豆类作物,莲花、苜蓿、木豆和鹰嘴豆的基因

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20180101266JC、 20200201027JC)

作者简介:龚招阳(1996-),男,在读本科,从事生物技术研究。

通讯作者:姚 丹,女,博士,教授,E-mail: jlauyd1977@sina.com
 刘洪霞,女,硕士,副研究员,E-mail: kyclhx@126.com

组测序工作已相继完成[2-7]。

彭玉华等^[8]对 64 份具有遗传稳定性的材料和 81 份大豆 F₁代杂交种进行分析发现,四粒荚的有 无与每荚粒数存在正相关性,四粒荚多的大豆品 种对产量因素的改良和提高产量都具有重要作 用。周新安等^[9]利用中豆 29 和中豆 32 杂交衍生 的重组自交系群体为材料,在不同种植密度条件 下分析大豆三、四粒荚与产量的关系,结果发现 在大豆重组自交系群体中,产量高的家系三粒荚 和四粒荚比例均高于亲本,充分说明在一定范围 内增加每荚粒数是提高大豆单产的一条有效途 径。王贤智等^[10]以大豆重组自交系 soy01 群体为 材料,针对大豆荚粒相关性状进行 QTL 定位分析 时发现,每荚粒数遗传力较高,达到 80.07%,并证 明该基因为主效 QTL,对产量的贡献率很大。

收稿日期:2018-11-28

SayamaT 等¹¹¹研究发现每荚粒数是构成大豆产量 的重要组成部分,每荚粒数可以提高大豆产量, 但不同品种间存在差异。目前关于大豆每荚粒数 的研究仅停留在表型相关性鉴定,BAC 文库的构 建及OTL定位研究等初级阶段,针对每荚粒数形 成的分子遗传学研究基础较为薄弱。大豆子房作 为成熟花器官的重要组成部分,在其发育初期对 子房内细胞分裂数目有着重要的影响,可能直接 影响大豆籽粒发育及品质形成。研究人员已经开 展了针对大豆根瘤、种子、叶片、茎秆、开花期等 不同生育时期的转录组分析[12-16],但还未见有以 大豆四粒荚突变体未授粉子房为材料的相关报 道。研究以项目组前期获得的大豆"吉农18"四粒 荚突变体为材料,采用Illumina/Solexa技术对未授 粉子房(R1- Beginning Flowering)进行转录组测序 分析,通过对差异表达基因筛选、功能注释及分析, 为大豆多粒荚相关基因功能鉴定及深入研究大豆 荚粒形成分子调控机理奠定理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本研究所选材料是 2008 年在吉林农业大学 生物技术中心进行室内抗旱实验中筛选得到的四 粒荚突变体材料,该材料系大豆品种吉农 18 (JN18)突变而来,其中突变体的四粒荚比率平均 高于野生型 20%,突变体小区产量较野生型材料 平均提高 15%左右。该突变体材料自 2008 年保 留栽种至今,经多年的田间鉴定筛选性状稳定。 2014年5月播种于吉林农大生物技术中心大棚试 验田中,7月初,取大豆 JN18 突变体及野生型植株 中上部的未授粉子房(R1-Beginning Flowering)材 料(图1),三次生物学重复,用锡箔纸包裹后液氮 速冻,保存于-80℃冰箱,用于后续转录组测序。



左一:吉农18野生型未授粉子房
 中间、右一:吉农18突变体未授粉子房
 图1 大豆吉农18突变体及野生型的未授粉子房

1.2.1 RNA提取与mRNA Illumina测序文库的 构建

大豆子房总 RNA 采用 Eastep[™] Universal RNA Extraction Kit(LS1000)提取。接下来按照 Illumina操作规程:先用 Invitrogen 公司的 Dynabeads[®]Oligo(dT)25试剂盒纯化 mRNA;然后利用随 机六聚体寡核苷酸引物和反转录酶合成 cDNA 第 一条链,利用 RNA 酶 H和 DNA 聚合酶合成 cDNA 第二条链。利用 Illumina 基因组样品准备试剂盒 构建一对末端 cDNA 文库:以 500 bp ladder 作为分 子量标准对照,切取 250~300 bp 的电泳条带,依据 QIAquick 凝胶回收试剂盒的 Protocol 进行胶的回 收纯化,然后进行 DNA 末端修复并连接测序接 头。利用 AMPureXP 磁珠去除不理想的片段后构 建 PCR 扩增测序文库。

1.2.2 差异基因分析

研究采用 IDE6 software 对差异基因进行检测,选用 General Chi squared 的假设检验方法,并 对检验结果进行 FDR (false discovery rate)校正, 选取低于 0.01 的阈值,并且 2 个样品中基因的最 高表达量达到最低表达量的 2 倍时,认为该基因 为差异基因。

1.2.3 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)分析

依据转录组测序结果,挑选出 10个在野生型 和突变体间都具有 GO 功能注释的差异表达基因 (log2 ratio=-19.49~19.43)为验证基因,其中 6 个为 上调表达基因,4 个为下调表达基因,利用 Beacon Disigner 8 设计荧光定量 PCR 引物,具体序列见表 1。这 10 个差异表达基因提取 RNA 时所用材料与 构建转录组差异文库完全相同。荧光定量 PCR 的 总反应体系为 25 μ L,包括 2 μ L cDNA (25 ng/ μ L), 12.5 μ L 2×SYBR premix Ex taq[™](Takara, Dalian, China), 10 μ M 上下游引物, 1.5 μ L dNTP (10 mM), 5 μ L ddH₂O,轻轻混匀后放置于 Agilent Technologies Stratagene Mx3000 P PCR 仪中进行循环反应。

循环反应条件为:95°C预变性3 min,94°C变性15 s,60°C退火和延伸40 s。研究采用大豆微管蛋白基因(Beta Tubulin, TUB4, XM_00355060)作为内参基因^[17],相对基因表达水平量通过ΔΔCt法进行计算^[18-19],每一个转录样本的相对表达水平通过 2-ΔΔCT法进行计算^[20](ΔΔCT=(CT, Target-CT, Tub4)Ti-mex-(CT, Target-CT, Tub4) Time 0)。

No.	#ID	Primer Sequence $(5' \rightarrow 3')$	log2 ratio	Annotation	
DECOI	Glyma20g29560.1	P1: GGAGCCAAATAGAACCGCACATAAC	10.42	lipid transport	
DEGUI		P2: AGTTCCTGTGTCCGAGTAAGTAGAG	19.43		
DEG02	Glyma06g20020.1	P1: GGATGTTCCTGGTCTCTCCAAGTCT	10.12		
		P2: GAATCCAACCTCTCCTCTCCAACCT	19.13	DNA binding	
DEGO		P1: CCCACATACCCATCTACCCAAAGC	10.07	binding	
DEG03	Glyma12g18960.1	P2:TCTCTGAACCTCTCCGTCCTGAC	18.87		
DEG04	Glyma08g44950.1	P1: AGGTCAGTGAGGAGGTTGCCAAGTA	15.66	DNA binding	
		P2: AGAAGGTCCACGAGTTGTAAGGATGG	15.66		
DEG05	Glyma18g33910.1	P1: ACACAACTCTTTAAGGATGGCAACCC	14.40	DNA binding	
		P2: AAGATACAAGACACAAGCCGAGTACG	14.42		
	Glyma07g17000.1	P1: GACTGCTTGCTTCAATGC		fatty acid binding	
DEG06		P2:CGATGCTGCTATGTCTCA	13.58		
DEC07	Glyma05g33340.1	P1:TTCAACCCTTACAGCAAC	17.00		
DEG07		P2:GTACGTGACGAAATCCAG	-17.98	protein binding	
DECOS	Glyma16g01440.1	P1: ATACCTAAACAATCCACCAG	10.70	response to high light intensity	
DEG058		P2:CCATAAACATAAACCACCC	-18.70		
DECOO	Cl 04 40700 1	P1: ATGGCGATTTCCGATGAG	10.42	11.	
DEG09	Glyma04g40790.1	P2: GGAACTGTCGGTGGTCGT	-19.43	protein folding	
DECIO	Cl 10 40040 1	P1: ATGGCAACTAATGGAGTC	10.40		
DEG10	Glyma18g42240.1	P2:CTGGTCTTTCTGGAGGAT	-19.49	heat acclimation	
THE A	EN2(2740	P1: GGCGTCCACATTCATTGGA		1 1 1	
TUB4	EV263740	P2:CCGGTGTACCAATGCAAGAA		beta-tubulin	

表1 差异基因荧光定量引物序列

注:#ID 表示差异基因的 ID 值; Annotation 代表差异基因在 GO 数据库中的功能注释信息

2 结果与分析

2.1 大豆总 RNA 提取及质量检测

研究采用 Eastep[™]通用型总 RNA 提取试剂盒 提取大豆子房总 RNA,经 1%非变性琼脂糖凝胶 电泳检测(图 2),均可见 28S、18S 两条清晰明亮、 集中、且无拖尾现象的条带。说明研究提取总 RNA 的纯度及浓度均较高,能够满足后续文库构 建及 RT-PCR 的要求。

2.2 RNA测序基本数据分析

2.2.1 测序与序列组装

利用Illumina测序技术对大豆四粒荚突变体

及野生型 R1-Stage(未授粉子房)的 cDNA 样品进 行测序。如表 2 所示,突变体与野生型样品均获 得超过 4G 的转录组测序数据, Cycle Q20 的比值



M:DGL2000 DNA Marker 1-2: 大豆总 RNA 图 2 大豆子房总 RNA 提取的琼脂糖凝胶电泳图

表 2	大豆子房突变体与野生型测序原始片段及相关信息统计
-----	--------------------------

样 品	Data (bp)	GC(%)	Cycle Q20(%)	Mapped Reads	Perfect Reads	InDel
子良穷亦休	4 400 207 856	16 19	100	15 186 073	7 018 883	14 712 213
了历天文评	4 400 207 830	40.48	100	/68.33%	/46.21%	/96.87%
子房野生型	4 686 416 658	46.34	100	16 094 490	7 487 011	15 605 648
				/67.99%	/46.51%	/96.96%

注:Data 表示总的碱基数;GC(%)表示碱基G和C数占总碱基数的比例;CycleQ20(%)表示质量不低于20的碱基比例;Mapped Reads表示与参考基因组比对上的Reads数;Perfect Reads表示没有错配,没有插入缺失,唯一比对在基因组上的Reads数;InDel 表示插入缺失的Reads数

均为100%。与大豆参考基因组比对结果显示, Mapped reads比对上的概率平均达到68.16%, Perfected reads比对上的概率平均达到46.36%, InDel 的比例高达96.9%, 说明测序数据质量较高。 2.2.2 RNA测序数据的差异表达分析 根据差异基因分析方案,在大豆子房突变体 与野生型中共发现2060个差异表达基因,其中上 调表达基因数量为1381个,下调表达基因数量为 679个,log2 ratio 值大于10的差异表达基因数为 75个(表3)。

表3 大豆子房突变体与野生型差异基因统计纠	吉果
-----------------------	----

 种 类	上调基因数	下调基因数	差异基因总数	llog2 ratiol≥10基因数
子房突变体_vs_子房野生型	1 381	679	2 060	75

2.3 差异表达基因的注释分析

2.3.1 GO功能分析

GO分析结果显示,在未授粉子房期差异表达 基因被划为三个大类别和61个小类别,其中有18 个小类别被归为细胞组分(Cellular component),18 个小类别被归为分子功能(Molecular function),25 个小类别被归为生物学过程(Biological process)。 如图3所示,在细胞组分类别中参与细胞部分(Cell part)节点的DEGs unigene 是最多的,为1759个,占 21.5%;在生物学过程类别中参与编码细胞过程 (Cellular process)和代谢过程(Metabolic process) 的 DEGs unigene 是最多的,分别为1633个和1557 个,占13.03%和12.42%;在分子功能类别中编码 结合蛋白(Binding)的 DEGs unigene 最多,为1303, 所占比例为44.62%。以 P-value ≤ 0.05 为阈值,在 大豆子房突变体与野生型中差异表达基因共筛选 到 104个显著富集的 GO term,其中与逆境反应 (Response to stress)、水匮乏反应(Response to water deprivation)等相关条目所占比例最高,其次是 乙醇反应(Response to ethanol)、蛋白低聚反应 (Protein oligomerization)等生物学过程。



注: 横坐标代表 GO 分析的基因功能分类, 从左至右依次为细胞组成, 分子功能和生物学过程; 左侧纵坐标代表差异基因所占的比例, 右侧纵坐标代表差异基因的数量

邹J 人立丁厉左开衣込奉囚的GU切能刀

No.	KEGG Pathway	ko_ID	Cluster_frequency	Genome_frequency	P-value	Q_value
1	Plant hormone signal transduction	ko04075	57 out of 305 18.69%	742 out of 9217 8.05%	1.04E-09	9.66E-08
2	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	ko00630	15 out of 305 4.92%	96 out of 9217 1.04%	5.15E-07	4.79E-05
3	beta-Alanine metabolism	ko00410	11 out of 305 3.61%	101 out of 9217 1.10%	0.000487	0.045289
4	Arginine and proline metabolism	ko00330	17 out of 305 5.57%	208 out of 9217 2.26%	0.000528	0.049122
5	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	ko00520	2 out of 3 66.67%	249 out of 9217 2.70%	0.002142	0.008568
6	Starch and sucrose metabolism	ko00500	2 out of 3 66.67%	296 out of 9217 3.21%	0.003018	0.012073
7	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	ko00290	1 out of 3 33.33%	90 out of 9217 0.98%	0.029012	0.116047
8	Protein processing in endoplasmic reticulum	ko04141	52 out of 338 15.38%	429 out of 9217 4.66%	2.01E-12	1.63E-10

表4 差异表达基因显著性富集路径(Q_value ≤0.05)

2.3.2 KEGG路径显著性分析

研究以 Q_value<0.05 为阈值,满足该条件的 pathway 定义为在差异表达基因中显著富集的 pathway。测序结果未授粉子房期有 338 个差异基 因的 unigene 参与到 81 条代谢途径中。其中有 8 条代谢途径是 Q_value<0.05 的显著差异的 pathway (表4)。在 8 条显著富集的 pathway 中,与氨基酸 代谢相关的占多数,其次是碳代谢相关的 pathway,最后是植物激素的信号转导和蛋白加工。

2.4 差异表达基因 qRT-PCR 分析

针对上述 10 个差异表达基因进行 qRT-PCR 验证,结果如图 4 所示,总体上这些基因的表达模 式与 RNA-Seq 的分析结果保持一致,证实了 RNA 测序结果的可靠性,具体表达量倍数的差异可能 是由于两种技术之间运算法则不同造成的。



注: 横坐标代表差异表达差异基因; 纵坐标代表差异表达倍数 (Fold change/log2 ratio)

图 4 10 个差异基因的实时定量 PCR 和 转录组分析的相对表达水平

3 结论与讨论

通过对四粒荚突变体与野生型未授粉子房 RNA测序差异表达基因(DEGs)的分析,结果显示 共有206个log2 ratio值大于3.0的上调表达基因, 其中103个上调表达基因具有功能注释。GO差 异显著富集分析结果显示,这些上调基因参与催 化反应、RNA水平调控、碳代谢、脂质转运、酶活 性的调控、初级和次级代谢调控、耐受性反应及 其他的生物代谢途径。在103个差异表达基因中 与蛋白结合、DNA结合相关的基因所占的比例最 高为36%,其次是与金属离子结合和脂质转运相 关的基因所占比例分别为15%和13%。这些与蛋 白结合、DNA结合、金属离子结合和脂质转运相 关上调表达的DEGs很可能是与大豆多粒荚建成 或产量调控相关的关键基因,下一步将围绕这些 关键基因做深入研究。

本研究在对差异基因进行 pathway 显著富集

分析时,发现在三个不同发育阶段中共有8条代 谢途径是Q_value≤0.05的显著富集的pathway。其 中,与氨基酸合成与代谢相关的pathway占多数, 其次是碳代谢相关的 pathway、植物激素信号转导 和蛋白加工的 pathway。Ugalde T D 等[21]报道,用 0.5g N/L(谷氨酸作为氮源)培养离体小麦穗,蛋 白质沉积速率接近田间水平,如果以2gN/L培 养,蛋白质沉积速率增加1倍,因此,研究认为增 加穗中谷氨酸的输入会加快蛋白质的合成。Doehlert DC等^[22]报道,玉米籽粒中蔗糖合成酶活性 与其淀粉积累呈正相关,而与其蔗糖酶活性不相 关。王志敏等[23]发现蔗糖酶在整个小麦穗粒发育 期均起重要作用,特别是穗发育后期作用更大, 蔗糖合成酶在籽粒淀粉合成中起重要作用。 Wang Fei 等^[24]报道, 蔗糖合成酶是控制果实发育 过程中起关键作用的调节酶,研究发现西红柿果 实生长率和果实淀粉积累与果实中的蔗糖合成酶 活性呈正相关,而与果实中蔗糖酶活性无关。综 上所述,本研究初步推测这些在大豆RNA水平上 获得的显著富集的 KEGG Pathway 很可能与大豆 多粒荚的形成及产量调控机制相关。

参考文献:

- Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics[J]. Nature Reviews Genetics, 2009, 10(1):57– 63.
- [2] Shusei S, Yasukazu N, Takakazu K, et al. Genome Structure of the Legume, Lotus japonicus[J]. DNA Research, 2008, 15(4): 227-239.
- [3] Schmutz J, Cannon S B, Schlueter J, et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean [J]. Nature, 2010, 465(7294):120.
- Young N D, Debelle F, Oldroyd G E, et al. The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses
 [J]. Nature, 2011, 480 (7378):520-524.
- [5] Varshney R K, Chen W, LI Y, et al. Draft genome sequence of pigeonpea (*Cajanus cajan*), an orphan legume crop of resourcepoor farmers [J]. Nature. Biotechnology, 2011, 30(1):83–89.
- [6] Varshney R. K., Song C, Saxena R K., et al. Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement[J]. Nature. Biotechnology, 2013, 31 (3):240– 246.
- Jain M, Misra G, Patel R K, et al. A draft genome sequence of the pulse crop chickpea (*Cicer arietinum* L.) [J]. Plant Journal, 2013, 74 (5):715–729.
- [8] 彭玉华,朱健超,杨国保,等.大豆叶形分布与四粒荚[J].作物学报,1994,20(4):501-503.
- [9] 周新安,王贤智,蔡淑平,等.大豆重组自交系群体三、四粒 荚变异及其与产量的关系[J].中国油料作物学报,2005,27 (4):22-25.
- [10] 王贤智,张晓娟,周 蓉,等.大豆重组自交系群体荚粒性

状的QTL分析[J].作物学报,2007,33(3):441-448

- [11] Sayama T, Tanabata T, Saruta M, et al. Confirmation of the pleiotropic control of leaflet shape and number of seeds per pod by the Ln gene in induced soybean mutants[J]. Breeding ence, 2017, 67(4): 363-369.
- [12] Jackson S A, Iwata A, Lee S H, et al. Sequencing crop genomes: approaches and applications[J]. New Phytologist, 2011, 191(4):915-925.
- [13] Jain M. Next-generation sequencing technologies for gene expression profiling in plants [J]. Brief. Funct. Genomics, 2012, 11 (1): 63-70.
- [14] Janwar S, Priya P, Garg R, et al. Transcriptome sequencing of wild chickpea as a rich resource for marker development [J]. Plant Biotechnology Journal, 2012, 10(6):690-702.
- [15] 秦雯婷,杨才琼,邓俊才,等.大豆种子老化的转录组学分析[J].东北农业大学学报,2018,49(3):1-9.
- [16] 任梦露,刘卫国,刘 婷,等. 荫蔽胁迫下大豆茎秆形态建成的转录组分析[J]. 作物学报,2016,42(9):1319-1331.
- [17] 阳 丽,操志林,魏敏芝,等.水稻稻曲病及检测方法[J].东 北农业科学,2016,41(2):67-69.
- [18] 尹松松,赵婷婷,李景富,等.外源ABA对番茄幼苗抗冷性 差异的研究[J].东北农业科学,2016,41(4):94-99.

- [19] Fan X D, Wang J Q, Yang N, et al. Gene expression profiling of soybean leaves and roots under salt, saline-alkali and drought stress by high-throughput Illumina sequencing[J]. Gene, 2013, 512(2): 392-402.
- [20] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method[J]. Methods (San Diego, Calif.), 2001, 25(4): 402-408.
- [21] Ugalde T D, Jenner C F. Route of substrate movement into wheat endosperm. I. Carbohydrates[J]. Functional Plant Biology, 1990, 17(6): 693-704.
- [22] Dochlert D C. Distribution of enzyme activities within the developing maize (*Zea mays*) kernel in relation to starch, oil and protein accumulation[J]. Physiologia Plantarum, 1990, 78(4): 560– 567.
- [23] 王志敏,王树安,苏宝林.小麦幼穗器官中蔗糖降解酶的活 性与分布[J].北京农业大学学报,1995,21(2):147-151.
- [24] Wang F, Sanz A, Brenner M L, et al. Sucrose Synthase, Starch Accumulation, and Tomato Fruit Sink Strength[J]. Plant Physiol, 1993, 101(1):321-327.

(责任编辑:刘洪霞)

(上接第28页)

- [8] He F, Pan Q H, Shi Y, et al. Biosynthesis and Genetic Regulation of Proanthocyanidins in Plants[J]. Molecules, 2008, 13(10): 2674-2703
- [9] Mehdy M C, Lamb C J. Chalcone isomerase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding and infection[J]. Plant Physiol, 1988, 86(1): 182.
- [10] Nishihara M, Nakatsuka T, Yamamura S. Flavonoid components and flower color change in transgenic tobacco plants by suppression of chalcone isomerase gene[J]. Febs Letters, 2005, 579(27): 6074.
- [11] 王巍巍,魏春雁,张之鑫,等.不同种稻年限盐碱地水田表 层土壤酶活性变化及其与土壤养分关系[J].东北农业科 学,2016,41(4):43-48.
- [12] 张 倩,班颖珏,张海婷,等.松茸子实体活性多肽提取工 艺[J].东北农业科学,2017,42(4):59-62.
- [13] 任志龙,吕俊丽,王 涵,等.酶-微波法协同提取莜麦酚类 物质工艺的研究[J].东北农业科学,2019,44(4):89-93.
- [14] Mckhann H I, Paiva N L, Dixon R A, et al. Expression of Genes for Enzymes of the Flavonoid Biosynthetic Pathway in the Early Stages of the Rhizobium -Legume Symbiosis[J]. Advances in Experimental Medicine & Biology, 1998, 439: 45-54.
- [15] 贺红霞,陈 亮,康 爽,等.玉米 ZmSUT4-J 基因的克隆与 植物表达载体构建[J].吉林农业科学,2015,40(3):18-22.
- [16] Ngaki M N, Louie G V, Philippe R N, et al. Evolution of the chalcone-isomerase fold from fatty-acid binding to stereospecific catalysis[J]. Nature, 2012, 485(7399): 530–533.
- [17] Shimada, N. A Cluster of Genes Encodes the Two Types of Chalcone Isomerase Involved in the Biosynthesis of General Flavonoids and Legume-Specific 5-Deoxy(iso)flavonoids in Lotus

japonicus[J]. Plant Physiology, 2003, 131(3): 941-951.

- [18] Jez J M, Noel J P. Reaction mechanism of chalcone isomerase: pH-dependence, diffusion control, and product binding differences[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(2): 1361– 1369.
- [19] Jez J M, Bowman M E, Dixon R A, et al. Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase[J]. Nature Structural Biology, 2000, 7(9): 786–791.
- [20] 任超翔, 唐小慧, 何 雯, 等. 红花查尔酮异构酶基因的克 隆及表达分析[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(9): 1521-1525,1574.
- [21] 王 蕊, 邹庆军, 郭巧生, 等. 杭菊 CHI 基因的克隆及原核 表达[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(14): 3015-3021.
- [22] 倪 荣.蕨类植物查尔酮异构酶和查尔酮合酶功能研究 [D].济南:山东大学,2019.
- [23] 吴彦庆,赵大球,王 静,等.芍药查耳酮异构酶基因(CHI) 克隆、密码子偏好性分析以及蛋白结构功能预测[J].华北 农学报,2016,31(2):71-80.
- [24] 吴 冰,祝钦珑,郭余龙,等.查耳酮异构酶基因的分子特 征及其在基因工程中的应用[J].植物生理学通讯,2008,44 (1):175-181.
- [25] 刘长英,赵爱春,李 军,等.桑树查耳酮异构酶基因的克 隆与原核表达分析[J].林业科学,2013,49(2):39-45.
- [26] Lan X, Quan H, Xia X, et al. Molecular cloning and transgenic characterization of the genes encoding chalcone synthase and chalcone isomerase from the Tibetan herbal plant *Mirabilis himalaica*[J]. Biotechnology&Applied Biochemistry, 2016, 63(3): 419-426.

(责任编辑:刘洪霞)