

花青素合成关键酶基因的定位及结构分析

朱晓双¹, 刘春燕², 杨振¹, 蒋洪蔚², 陈庆山¹, 胡国华^{2,3}

(1. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农垦科研育种中心, 黑龙江 哈尔滨 150090; 3. 国家大豆工程技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150050)

摘要:为研究大豆花青素合成途径关键酶的基因标记和结构信息, 利用大豆基因组和染色体标记数据, 对16个花青素合成关键酶基因(苯丙氨酸解氨酶(PAL)、查尔酮合酶(CHS, 包括9个成员)、黄烷酮-3-羟化酶(F3H)、苯基苯乙烯酮黄烷酮异构酶(CHI)、二氢黄酮醇还原酶(DFR)和4-香豆酰 CoA 连接酶(4CL), 进行基因遗传图和物理图定位和基因结构分析。结果表明:16个基因分别定位在A1、A2、B1、B2、D1a、D1b、D2、I、K、O等10个连锁群上, 并获得了基因所在序列两侧标记。利用大豆的cDNA和gDNA序列信息, 获得了16个基因的结构, 外显子数目1~7个, 内含子数目0~6个, 其中PAL、DFR2、GmCHS7是单外显子基因, 4CL、CHI、F3H、GmCHS1、GmCHS5、GmCHS8有1个内含子, DFR1、GmCHS2、GmCHS3、GmCHS6有2个内含子, GmCHS4、GmCHS9有3个内含子, GmIRCHS则有6个内含子。

关键词:大豆; 花青素; 基因; 定位; 基因结构

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2011)01-0024-05

Mapping and Structure Analysis of Key Enzyme Genes in Anthocyanin Synthesis of Soybean

ZHU Xiao-shuang¹, LIU Chun-yan², YANG Zhen¹, JIANG Hong-wei², CHEN Qing-shan¹, HU Guo-hua^{2,3}

(1. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 2. The Crop Research and Breeding Center of Land-Reclamation, Harbin 150090; 3. The National Research Center of Soybean Engineering and Technology, Harbin 150050, Heilongjiang, China)

Abstract: Seedcoat mottling would be induced in soybean when infected by soybean mosaic virus, which could be greatly decrease the economic value. Seedcoat mottling of soybean was due to the abnormal accumulation of flavonoid. And anthocyanin belongs to flavonoid was a kind of major secondary metabolites. Sixteen genes of key enzyme in anthocyanin synthesis, including PAL, chalcone synthase (9 members of CHS family), F3H, CHI, DFR, and 4CL, were mapped on the soybean linkage groups, based on the soybean genome sequence and marker information, and their gene structures were analyzed. The results showed that 16 genes were mapped on ten linkage groups, including A1, A2, B1, B2, D1a, D1b, D2, I, K, and O, and the flank markers of the gene on the linkage groups were obtained. Furthermore, the sequence information between cDNA and gDNA was compared, the number of exon was from 1 to 7, and the number of intron was from 0 to 6. Among them, PAL, DFR2, and GmCHS7 were all single-extron gene, but there were one intron in 4CL, CHI, F3H, GmCHS1, GmCHS5, and GmCHS8, two introns in DFR1, GmCHS2, GmCHS3, and GmCHS6, three introns in GmCHS4 and GmCHS9, and six introns in GmIRCHS. The corresponding markers obtained from the mapping were available for molecular assisted selection, while the structure information could be better used in gene function analysis.

Key words: Soybean; Anthocyanin; Gene; Mapping; Gene structure

大豆花叶病毒病(Soybean Mosaic Virus, SMV)是世界性大豆病害,在我国各大豆产区都有发生,既可以导致大豆成株感病使得产量降低,又会引起种粒斑驳,严重影响着大豆的经济和商品价值。目前,吴宗璞等将大豆种粒斑驳按颜色分为:淡褐斑、深褐斑、赤褐斑、黑褐斑、灰褐斑等7种,并于2000

年提出,大豆种粒斑驳是类黄酮(flavonoid)在种皮上的异常积累^[1]。花青素(anthocyanin)是植物体内很重要的一大类次生物质,属于类黄酮。花青素又称花色素,是广泛存在于植物中的水溶性色素,广泛存在于27个科72个属的被子植物中^[2]。花青素的基本结构为2-苯基并吡喃盐。在3,5,7-碳位

收稿日期:2010-11-30

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30871551)。

第一作者简介:朱晓双(1986-),女,在读硕士,研究方向为分子辅助育种。E-mail: zhuxiaoshuang305@126.com。

通讯作者:胡国华(1951-),男,研究员,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: Hugh757@vip.163.com。

上有取代羟基。由于 A 环和 B 环各碳位上的取代基不同(羟基或甲氧基),形成了各种各样的花青素。在自然状态下,3,5-碳位上常和糖结合成糖配体,以糖苷形式存在,称花色苷。由于花色苷的高生物化学反应活性,使其对细胞具有毒害作用。因此,花色苷被合成后立即由细胞质运送到液泡、细胞壁等其它部位储存^[3-7]。苯丙氨酸是类黄酮生物合成的直接前体,花青素在细胞质中从苯丙氨酸经一系列的酶促反应合成,经不同的羟基化、

糖基化、甲基化、酰基化修饰后被转运到液泡中予以汇集^[8,9]。花青素的生物合成代谢途径可以分为 5 个阶段(图 1)。首先,苯丙氨酸在苯丙氨酸解氨酶和肉桂酸羧化酶催化生成 4-香豆酰 CoA。然后 4-香豆酰 CoA 和丙二酰 CoA 结合在查尔酮合成酶(CHS)和黄酮酮-3-羟化酶(F3H)作用下生成二氢黄酮醇^[10-11]。最后在二氢黄酮醇还原酶(DFR)、花青素合成酶(ANS/LDOX)将无色的二氢黄酮醇转化成无色花青素进而合成未修饰的花青素^[8]。

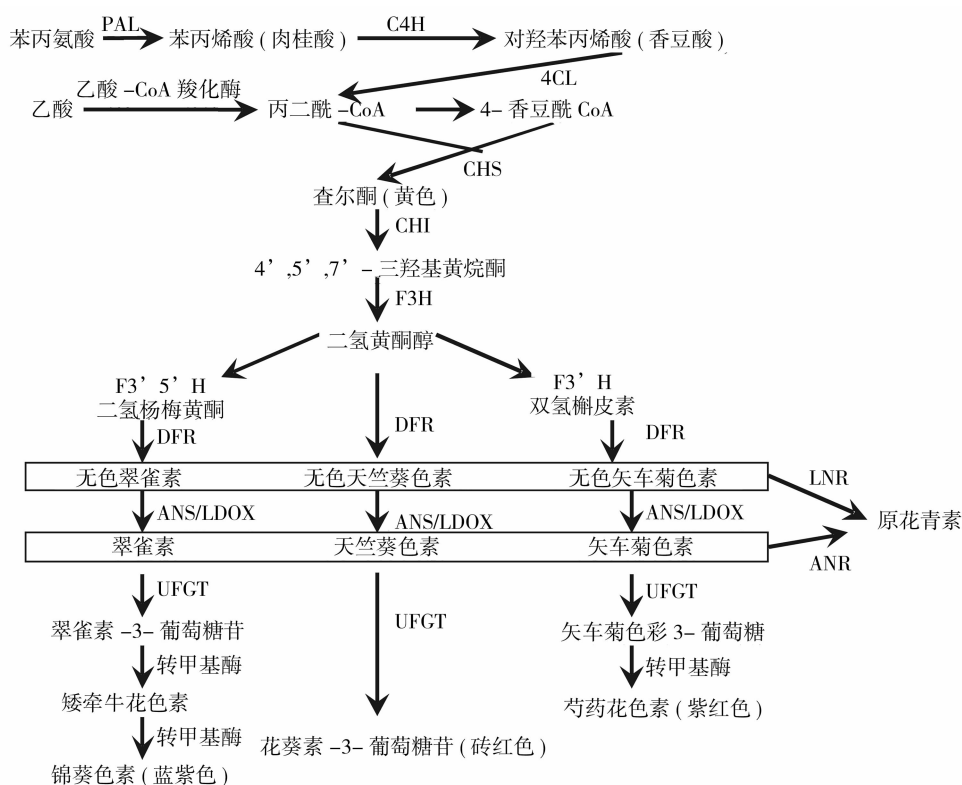


图 1 花青素生物合成途径 (Holton and Cornish 1995)

Fig. 1 The metabolic pathway of anthocyanin

为了解大豆花青素合成途径关键酶基因对大豆种粒斑驳的影响,利用大豆基因组和染色体标记信息完成 16 个花青素合成关键酶基因的定位,获得对应分子标记,并进行基因结构分析。基因的分子标记可以为基因的分子辅助育种提供参考资料,而基因结构信息能更好的分析基因功能。

1 材料与方法

1.1 试验材料

从 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载 16 个大豆花青素合成中关键的酶基因(表 1)。并从 NCBI 网站下载用于进行本地比对的 Blast 2.2.16 软件包。从 Phytozome 网站 (<http://www.phytozome.net/search.php?show=blast>) 下载

大豆基因组序列并进行在线比对。

1.2 试验方法

1.2.1 格式化数据库 在开始运行中打 cmd 进入 DOS 命令行,用 cd 命令进入 blast 安装目录。

formatdb 命令格式:formatdb -i c:|***|***.txt -p F -o T 其中-i 是输入文件的地址,-p 指示要格式化的数据是蛋白还是核酸,如果是蛋白,则输入-p T,如果是核酸,则输入-p F,-o 指是否要输出,是则输入 T,参数输入使用大写。

1.2.2 用基因序列进行本地比对(local blast) 在开始运行中打 cmd 进入 DOS 命令行,用 cd 命令进入 blast 安装目录。

blastall -p blastn -d c:|***|***.*** -i c:|***|***.txt -e 2e-10 -m8 -o c:|***|***.txt

-p 指定用于比对的程序,核酸和核酸数据库之间比对用 blastn,蛋白与蛋白数据库之间比对用 blastp,蛋白与核酸数据库之间比对用 tblastn,核酸与蛋白数据库之间比对用 blastx。

-e 指定期望值,只有低于这个值的比对才会被显示。

-d 指定数据库所在目录。

-i 指定要比较的序列所在的目录。

-m 指定输出的格式为表格,总共有 11 种输出格式,默认的是经典的 blast 格式,即比对序列上下排列,匹配的核苷酸或氨基酸残基之间用短线连接。

-o 指定输出结果到哪一个目录。

表 1 大豆花青素合成关键酶基因信息

Table 1 Information of the key genes in anthocyanin synthesis of soybean

名称 Name	登录号 Accession No.	功能 Function	参考文献 Reference
<i>PAL</i>	GQ220305	催化 L-苯丙氨酸脱氢生成肉桂酸和氨	Wang et al. Unpublished (2009)
<i>4CL</i>	FJ770469	催化苯丙烯酸生成对羟苯丙烯酸(香豆酸)	Tranta et al. Unpublished(2009)
<i>CHI</i>	FJ770472	催化苯基苯乙烯酮形成环烷酮	Tranta et al. Unpublished(2009)
<i>F3H</i>	AY595420	催化 4,5,7-三羟基黄酮生成二氢黄酮醇	Ralston et al. ^[12] (2005)
<i>DFR1</i>	AF167556	Unknown	Tang et al. Unpublished(1999)
<i>DFR2</i>	EF187612	Unknown	Xu et al. ^[13] (2010)
<i>GmCHS1</i>	X54644	Unknown	Akada et al. ^[14] (1991)
<i>GmCHS2</i>	X65636	Unknown	Akada et al. ^[15] (1993)
<i>GmCHS3</i>	X53958	Unknown	Akada et al. ^[16] (1990)
<i>GmCHS4</i>	X52097	Unknown	Akada et al. ^[17] (1990)
<i>GmCHS5</i>	L07647	Unknown	Akada et al. Unpublished(1999)
<i>GmCHS6</i>	L03352	Unknown	Akada et al. ^[18] (1994)
<i>GmCHS7</i>	M98871	Unknown	Akada et al. ^[19] (1993)
<i>GmCHS8</i>	AY237728	Unknown	Akada et al. Unpublished(2003)
<i>GmCHS9</i>	EF623853	Unknown	Tuteja et al. ^[20] (2008)
<i>GmIRCHS</i>	AB480070	诱导查尔酮合酶基因的内源 RNA 沉默	Kasai et al. ^[21] (2009)

1.2.3 基因的电子定位 将下载大豆基因组序列进行本地建库,用大豆公共图谱上的标记序列信息与本地大豆基因组序列库进行比对,将得到的结果按照匹配度的大小择优,经过筛选,共有 160 个拼接的 Super(占序列总数据的 72.77%)定位到连锁群上,用 MapChart2.1 画出连锁群,并按照比对的结果将 Super 画在与之相应的标记位置,得到了一套物理图谱与遗传图谱的整合图谱。

由本地比对的结果可以得到基因定位的具体信息,并结合整合的图谱确定该基因定位的连锁群,最后根据比对结果得出定位在 Super 上的位置,确定距离基因较近的标记。

2 结果与分析

2.1 基因的物理图定位

将合成花青素的关键酶基因与大豆基因组进行本地比对(表 2),表明具有内含子的基因与基因组比对时存在多基因联配、匹配区段的 E 值和平均

匹配率。基因与基因组匹配的 E 值均接近于 0,平均匹配率都在 96% 以上,其中 *GmCHS1*、*GmCHS2*、*GmCHS5*、*GmCHS6*、*GmCHS7* 和 *GmCHS9* 平均匹配率达到 100%,表明基因与基因组的匹配区段是可信的。

2.2 基因的遗传定位

根据基因与基因组匹配区段将 16 个花青素合成关键酶基因分别定位在 A1、A2、B1、B2、D1a、D1b、D2、I、K、O 等 10 个连锁群上(表 3)。其中 *4CL* 和 *GmCHS7* 基因定位在 D1a 连锁群上,*GmCHS1*、*GmCHS3*、*GmCHS4*、*GmCHS5*、*GmCHS9* 和 *GmCHS10* 基因定位在 A2 连锁群上,并与 *GmCHS3* 和 *GmCHS4* 基因两侧的标记相同。如:PAL 基因定位于 O 连锁群的 5311320-5307097 之间,两侧的标记分别为 BARCSOYSSR_10_0314 和 BARCSOYSSR_10_0315,SSR 标记的起始位置和终止位置分别在 5284013,5284056 和 5319161,5319239。

表 2 大豆花青素合成关键基因的物理图定位

Table 2 Physical mapping result of the key genes in anthocyanin synthesis of soybean

名称	基因长度	基因匹配区段	基因组匹配区段	E 值	平均匹配率
Name	Length/bp	Gene matched sequence	Genome matched sequence	E-value	Identity/%
<i>PAL</i>	2284	1-2284	5311320-5307097	0	99.7
<i>4CL</i>	1697	1-1697	54978159-54974208	0	99.2
<i>CHI</i>	681	1-681	46136060-46135089	2.8E-132	99.1
<i>F3H</i>	1423	1-1423	4388772-4392295	0	99.8
<i>DFR1</i>	1279	1-1279	6000577-6004789	8.9e-1761.6e-77	96.3
<i>DFR2</i>	7088	1-7088	40918221-40925326	0	99.1
<i>GmCHS1</i>	1314	1-1314	8469896-8468461	3.00E-87	100.0
<i>GmCHS2</i>	2208	1-2208	34420271-34422479	0	100.0
<i>GmCHS3</i>	4047	1-4047	8471943-8475990	0	99.9
<i>GmCHS4</i>	2323	1-2323	8478307-8475985	0	99.8
<i>GmCHS5</i>	2031	1-2031	8379938-8381968	0	100.0
<i>GmCHS6</i>	2595	1-2595	8196216-8193622	0	100.0
<i>GmCHS7</i>	2688	1-2688	54741986-54744673	0	100.0
<i>GmCHS8</i>	2856	1-2856	792901-795757	0	99.9
<i>GmCHS9</i>	3375	1-3375	8465970-8462596	0	100.0
<i>GmIRCHS</i>	6482	1-6482	8443874-8468257	0	99.6

表 3 大豆花青素合成关键酶遗传图基因定位

Table 3 Genetic mapping result of the key genes in anthocyanin synthesis of soybean

名称	基因组匹配区段	标记	标记起始位置	标记终止位置	连锁群
Name	Genome matched sequence	Marker	start_position	end_position	LG
<i>4CL</i>	54978159-54974208	BARCSOYSSR_01_1685	54967308	54967327	D1a
		BARCSOYSSR_01_1686	55059335	55059362	
<i>CHI</i>	46136060-46135089	BARCSOYSSR_20_1324	45724715	45724734	I
		BARC-017125-02212	46462573	46463423	
<i>F3H</i>	4388772-4392295	BARCSOYSSR_02_0239	4386254	4386275	D1b
		BARCSOYSSR_02_0240	4467724	4467745	
<i>DFR1</i>	6000577-6004789	BARCSOYSSR_14_0344	6000373	6000436	B2
		BARCSOYSSR_14_0346	6012883	6012914	
<i>DFR2</i>	40918221-40925326	BARCSOYSSR_17_1610	40918162	40918223	D2
		BARCSOYSSR_17_1611	40963064	40963085	
<i>GmCHS1</i>	8469896-8468461	BARCSOYSSR_08_0468	8444501	8444520	A2
		BARCSOYSSR_08_0469	8509979	8510010	
<i>GmCHS2</i>	34420271-34422479	BARCSOYSSR_05_1031	34407424	34407443	A1
		BARC-030907-06967	34437427	34436400	
<i>GmCHS3</i>	8471943-8475990	BARC-010953-01740	8471757	8471042	A2
		BARCSOYSSR_08_0469	8509979	8510010	
<i>GmCHS4</i>	8478307-8475985	BARC-010953-01740	8471757	8471042	A2
		BARCSOYSSR_08_0469	8509979	8510010	
<i>GmCHS5</i>	8379938-8381968	BARCSOYSSR_08_0462	8374248	8374309	A2
		BARCSOYSSR_08_0463	8386041	8386092	
<i>GmCHS6</i>	8196216-8193622	BARCSOYSSR_09_0467	8169337	8169394	K
		BARCSOYSSR_09_0468	8212985	8213006	
<i>GmCHS7</i>	54741986-54744673	BARCSOYSSR_01_1679	54710668	54710741	D1a
		BARCSOYSSR_01_1680	54783744	47837675	
<i>GmCHS8</i>	792901-795757	BARCSOYSSR_11_0038	788385	788458	B1
		BARCSOYSSR_11_0039	887437	887456	
<i>GmCHS9</i>	8465970-8462596	BARCSOYSSR_08_0468	8444501	8444520	A2
		BARC-039247-07486	8469980	8469125	
<i>GmIRCHS</i>	8443874-8468257	BARCSOYSSR_08_0467	8437244	8437293	A2
		BARC-039247-07486	8469980	8469125	

2.3 基因结构分析

根据比对结果确定了这 16 个花青素合成关键基因的长度为 681 ~ 7088 bp, 外显子数目 1 ~ 7 个, 内含子的数目 0 ~ 6 个(表 4)。其中 PAL、DFR2 和 GmCHS7 是单外显子基因。其余基因均有内含子。

表 4 大豆花青素合成关键酶基因比对信息
Table 4 Blast information of the gene structure in anthocyanin synthesis of soybean

名称 Name	登录号 Accession	cDNA 基因长度 cDNA length /bp	gDNA 基因长度 gDNA length /bp	外显子 No. of extron	内含子 No. of intron
PAL	GQ220305	2284	4224	1	0
4CL	FJ770469	1697	3952	2	1
CHI	FJ770472	681	972	2	1
F3H	AY595420	1423	3524	2	1
DFR1	AF167556	1279	4213	3	2
DFR2	EF187612	7088	7106	1	0
GmCHS1	X54644	1314	1436	2	1
GmCHS2	X65636	2208	2209	3	2
GmCHS3	X53958	4047	4048	3	2
GmCHS4	X52097	2323	2323	4	3
GmCHS5	L07647	2031	2031	2	1
GmCHS6	L03352	2595	2595	3	2
GmCHS7	M98871	2688	2688	1	0
GmCHS8	AY237728	2856	2857	2	1
GmCHS9	EF623853	3375	3375	4	3
GmIRCHS	AB480070	6482	24384	7	6

3 结论与讨论

花青素属于类黄酮的一种, 是广泛存在于植物中的一种水溶性色素, 它所产生的颜色范围是从红色到紫色。大豆感染大豆花叶病毒(*Potyviridae*, Soybean mosaic virus, SMV) 所产生的种粒斑驳, 严重影响着大豆的经济和商品价值。吴宗璞等将大豆种粒斑驳按颜色分为: 淡褐斑、深褐斑、赤褐斑、黑褐斑、灰褐斑等 7 种, 并于 2000 年提出, 大豆种粒斑驳是类黄酮在种皮上的异常积累^[1]。查尔合酶(Chalcone synthase, CHS) 是类黄酮生物合成途径中的第一个关键酶。编码 CHS 的是一个多基因家族, 自 1990 年 Akada 等陆续在大豆中克隆得到了 9 个 CHS 基因。Bernard 等提出, 在大豆中至少有 3 个独立的基因位点(I, R, T) 控制种皮中的色素^[22]。其中, I 位点主要控制种皮中花青素和原花青素的积累。Atsushi Kasai 等 2007 年提出, I 基因的候选基因(GmIRCHS) 能够通过诱导 CHS 基因的内源 RNA 沉默从而抑制大豆种皮中色素积累^[23]。

在花青素合成途径中, 苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonialyase, PAL) 在花青素合成中即是诱导酶, 又是变速酶。查尔酮合酶(Chalcone synthase, CHS) 可与查尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI) 基因及二氢类黄酮还原酶(dihydroflavonol-reductase, DFR) 基因之间存在着相互作用。对 CHS 的反义调控可使花色素合成被打断, 从而使花色变淡, 甚至变成白花。黄烷酮 3-羟化酶(flavonoid 3-hydroxylase, F3H) 属于氧化戊二酸依赖型加氧酶(oxoglutaratedependent dioxygenases) 家族, F3H 是位于类黄酮合成通路分支点处的关键酶。可见, 花青素合成中的关键酶基因之间的互作, 是决定花青素合成与积累的关键。

该试验通过大豆基因组和染色体标记信息, 对 16 个花青素合成的关键酶基因进行遗传图及物理图定位, 确定了基因两侧的标记, 为基因的分子辅助育种提供参考资料。同时, 对花青素合成途径中关键酶基因的结构进行分析, 为进一步研究基因功能, 抑制花青素的合成, 降低种粒斑驳的形成比率, 提高大豆产量, 改善大豆品质奠定基础。

参考文献

- [1] 滕冰, 吴宗璞, 高凤兰, 等. 大豆种粒斑驳的基本化学组成[J]. 大豆科学, 2000, 19(3): 250-257. (Teng B, Wu Z P, Gao F L, et al. The basic chemical components of seed coat mottle in soybean[J]. Soybean Science, 2000, 19(3): 250-257.)
- [2] Annamaryju D S. Antioxidant ability of anthocyanins against ascorbic acid oxidation[J]. Phytochemistry, 1997, 45(4): 671-674.
- [3] Hrazdina G. Compartmentation in aromatic metabolism [M]// Stafford H A, Ibrahim R K. Phenolic metabolism in plants. New York: Plenum Press, 1992: 1-23.
- [4] Ibrahim R K. Immunolocalization of flavonoid conjugates and their enzymes [M]// Stafford H A, Ibrahim R K, eds. Phenolic metabolism in plants. New York: Plenum Press, 1992: 25-61.
- [5] Klein M, Weissenböck G, Dufaud A, et al. Different energization mechanisms drive the vacuolar uptake of a flavonoid glucoside and a herbicide glucoside [J]. Biological Chemistry, 1996, 271: 29666-29671.
- [6] Li Z S, Alfenito M, Rea P A, et al. Vacuolar uptake of the phytoalexin medicarpin by the glutathione conjugate pump [J]. Phytochemistry, 1997, 45: 689-693.
- [7] Grotewold E, Chamberlin M, Snook M, et al. Engineering secondary metabolism in maize cells by ectopic expression of transcription factors [J]. Plant Cell, 1998, 10: 721-740.
- [8] Holton T A, Cornish E C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis [J]. Plant Cell, 1995, 7: 1071-1083.
- [9] Mol J, Grotewold E, Koes R. How genes paint flowers and seeds [J]. Plant Science, 1998, 3: 212-217.

- [J]. 大豆科学, 2003, 22(1):32-35. (Qiu C X, Wu T L. Study on 6-BA to the regeneration of tip shoot of soybean[J]. Soybean Science, 2003, 22(1):32-35.)
- [2] 张东旭, 张洁, 商蕾, 等. 大豆胚尖再生体系的研究[J]. 河北农业大学学报, 2008, 30(4):7-13. (Zhang D X, Zhang J, Shang L, et al. Study on the regeneration system of soybean embryonic tips[J]. Journal of Hebei Agricultural University, 2008, 30(4):7-13.)
- [3] 刘海坤, 卫志明. 利用根瘤农杆菌介导转化大豆成熟种子胚尖获得转基因植株[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2004, 30(6):631-636. (Liu H K, Wei Z M. Transgenic soybean obtained with agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of embryonic tip of soybean mature seeds[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2004, 30(6):631-636.)
- [4] 林树柱, 曹越平, 卫志明, 等. 6-BA 诱导大豆子叶节和茎尖出芽的研究[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2005, 23(2):138-142. (Lin S Z, Cao Y P, Wei Z M, et al. Studies on shoots induced by 6-BA from cotyledonary nodes and embryonic tips of soybean[J]. Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science Edition), 2005, 23(2):138-142.)
- [5] 李海燕, 武小霞, 刘森, 等. 大豆子叶节、胚尖再生植株的研究[J]. 大豆科学, 2007, 26(5):709-712. (Li H Y, Wu X X, Liu S, et al. Plant regeneration from cotyledonary nodes and embryonic tips of soybean[J]. Soybean Science, 2007, 26(5):709-712.)
- [6] 孙文丽, 刘昱辉, 吴元华, 等. 大豆胚芽尖再生体系的建立及转基因初步研究[J]. 湖北农业科学, 2008, 47(6):615-618. (Sun W L, Liu Y H, Wu Y H, et al. A pilot study of an soybean embryonic tip regeneration system[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2008, 47(6):615-618.)
- [7] 刘海坤, 卫志明. 大豆遗传转化研究进展[J]. 植物生理与生物学报, 2005, 31(2):126-134. (Liu H K, Wei Z M. Recent advances in soybean genetic transformation[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2005, 31(2):126-134.)
- [8] 王萍, 张淑珍, 李文滨, 等. 大豆不同基因型胚尖不定芽的诱导及对抗生素的敏感性[J]. 作物杂志, 2010(2):50-53. (Wang P, Zhang S Z, Li W B, et al. Induction of adventitious shoots from embryonic tip of different soybean genotype and their sensibility to antibiotics[J]. Crops, 2010(2):50-53.)
- [9] 邹莉, 文艺, 张匀华, 等. 大豆子叶节对潮霉素敏感性研究[J]. 大豆科学, 2008, 27(2):267-269. (Zou L, Wen Y, Zhang Y H, et al. Susceptibility of soybean cotyledonary node to hygromycin B[J]. Soybean Science, 2008, 27(2):267-269.)

(上接第 28 页)

- [10] Huang J X, Qu L J, Yang J, et al. A preliminary study on the origin of chalcone synthase (CHS) gene: Molecular cloning of CHS-like gene from liverwort (*Lunularia cruciata*) and evolution of CHS genes in angiosperms[J]. Acta Botanica Sinica, 2004, 46: 10-19.
- [11] Yang J, Gu H Y, Yang Z. Likelihood analysis of the chalcone synthase genes suggests the role of positive selection in morning glories (*Ipomoea*) [J]. Molecular Evolution, 2004, 58: 54-63.
- [12] Ralston L, Subramanian S, Matsuno M, et al. Partial reconstruction of flavonoid and isoflavonoid biosynthesis in yeast using soybean type I and type II chalcone isomerases[J]. Plant Physiology, 2005, 137: 1375-1388.
- [13] Xu M, Brar H K, Grosic S, et al. Excision of an active CACTA-like transposable element from DFR2 causes variegated flowers in soybean (*Glycine max*) [J]. Genetics, 2010, 184:53-63.
- [14] Akada S, Kung S D, Dube S K. The nucleotide sequence of gene1 of the soybean chalcone synthase multigene family[J]. Plant Molecular Biology, 1991, 16(4): 751-752.
- [15] Akada S, Kung S D, Dube S K. Nucleotide sequence and putative regulatory elements of gene 2 of the soybean (*Glycine max*) chalcone synthase multigene family [J]. Plant Physiology, 1993, 102: 317-319.
- [16] Akada S, Kung S D, Dube S K. The nucleotide sequence of gene 3 of the soybean chalcone synthase multigene family [M]. Oxford University Press, 1990.
- [17] Akada S, Kung S D, Dube S K. Nucleotide sequence of one member of soybean chalcone synthase multi-gene family[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(11):3398.
- [18] Akada S, Kung S D, Dube S K. Nucleotide sequence of a soybean chalcone synthase gene with a possible role in ultraviolet-B sensitivity, Gmchs6[J]. Plant Physiology, 1993, 102: 699-701.
- [19] Akada S, Kung S D, Dube S K. Nucleotide sequence and putative regulatory elements of a nodule-development-specific member of the soybean (*Glycine max*) chalcone synthase multigene family, GmCHS7[J]. Plant Physiology, 1993, 102: 321-323.
- [20] Tuteja J H, Vodkin L O. Structural features of the endogenous CHS silencing and target loci in the soybean genome[J]. Crop Science, 2008, 48(S1), S49-S68.
- [21] Kasai A, Ohnishi S, Yamazaki H, et al. Molecular mechanism of seed coat discoloration induced by low temperature in yellow soybean[J]. Plant Cell Physiology, 2009, 50:1090-1098.
- [22] Bernard R L, Weiss M G. Qualitative genetics[M]// Caldwell B E (ed) Soybean: improvement, production, and uses. American Society of Agronomy, Madison, 1973:117-154.
- [23] Kasai A, Kasai K, Yumoto S, et al. Structural features of *GmIRCHS*, candidate of the I gene inhibiting seed coat pigmentation in soybean: implications for inducing endogenous RNA silencing of chalcone synthase genes [J]. Plant Molecular Biology, 2007, 64:467-479.