

大豆异黄酮合成途径相关基因差异表达分析

崔艳伟, 李文龙, 常文锁, 李喜焕, 张彩英

(河北农业大学/教育部华北作物种质资源研究与利用重点实验室, 保定 071001)

摘要:大豆异黄酮是一种应用广泛、具有医用和保健功能的活性物质。为揭示异黄酮合成途径相关基因表达差异, 本研究采用实时定量 PCR 技术分析相关基因在不同大豆品种、发育时期及组织部位的表达。结果发现, 苯丙氨酸解氨酶基因 *PAL*、肉桂酸羟化酶基因 *C4H*、香豆酸辅酶 A 连接酶基因 *4CL* 在高异黄酮品种中豆 27 R2 期叶片中的表达量显著高于低异黄酮品种楚秀; 查尔酮合成酶基因 *CHS*、异黄酮合成酶基因 *IFS* 在中豆 27 R8 期子粒中的表达量显著高于楚秀; 细胞色素还原酶基因 *CPR* 在中豆 27 R7 期叶片与子粒的表达量与楚秀相比显著降低。这些差异表达的基因可能是形成大豆品种异黄酮含量高低的重要原因。

关键词:大豆; 异黄酮合成; 相关基因; 差异表达

Differential Expression Analysis of Genes Associated with Isoflavone Synthesis in Soybean (*Glycine max* Merr.)

CUI Yan-wei, LI Wen-long, CHANG Wen-suo, LI Xi-huan, ZHANG Cai-ying

(North China Key Laboratory of Crop Germplasm Resources, Education Ministry of China, Agriculture University of Hebei, Baoding 071001)

Abstract: The soybean isoflavone is a kind of widely used active materials which has medical and healthcare functions. To analyze the differential expression patterns of genes associated with isoflavone synthesis in soybean, seven related genes were studied at different developmental stages and organs in different varieties by real-time quantitative PCR method. The results showed that the expression levels of phenylalanine ammonialyase *PAL*, cinnamate-4-hydroxylase *C4H* and 4-coumarate: coenzyme A ligase *4CL* in Zhongdou 27 (high isoflavone content variety) in leaves were significantly higher than that in Chuxiu (low isoflavone content variety) during the R2 growing period. Meanwhile, the expression levels of chalcone synthase *CHS* and isoflavone synthase *IFS* in Zhongdou 27 were significantly higher than that in Chuxiu during the R8 growing period in seeds. While the expression level of cytochrome P450 reductase *CPR* in Chuxiu was significantly higher than that in Zhongdou 27 during the R7 period in both of the leaves and seeds. Thus, these differential expression levels of related genes in different developmental stages and organs may be the main reasons to explain different seed isoflavone contents in soybean.

Key words: soybean; isoflavone synthesis; related genes; differential expression

异黄酮具有重要营养和医用价值, 但在植物界分布范围非常狭窄, 只局限于豆科蝶形花亚科, 如大豆、小白豆、苜蓿和绿豆等极少数植物, 其中以大豆

和苜蓿中的含量最高^[1-3]。然而, 即使是含量较高的大豆品种, 其子粒异黄酮含量也仅有 0.4% ~ 5.0%, 远不能满足国际市场的需求^[4-6]。

收稿日期: 2015-08-05 修回日期: 2015-09-12 网络出版日期: 2016-06-08

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20160608.1437.030.html>

基金项目: 河北省自然科学基金 (C2013204020); 河北省科技计划项目 (14226309D-5)

第一作者研究方向为大豆分子生物学与转基因研究。E-mail: cuiyanwei07@126.com

通信作者: 李喜焕, 研究方向为大豆遗传育种与转基因研究。E-mail: lixihuan@hebau.edu.cn

张彩英, 研究方向为大豆遗传育种与转基因研究。E-mail: zhangcaiying@hebau.edu.cn

大豆异黄酮合成代谢过程由苯丙烷途径和异黄酮合成途径共同组成^[7-9]。其中,苯丙氨酸与丙二酰辅酶 A 是异黄酮类物质合成的前体,该前体物质经苯丙氨酸解氨酶(PAL)、肉桂酸羟化酶(C4H)、香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL)、查尔酮合成酶(CHS)、查尔酮还原酶(CHR)、查尔酮异构酶(CHI)等多种酶的催化反应,经羟基化、甲氧基化和烷基化等过程形成不同类型的异黄酮化合物。大豆异黄酮合成途径中涉及的相关酶类(基因)约有几十种。而关于异黄酮合成关键酶或限速酶,虽研究报道较多,所得结论不尽相同^[10-12]。因此,研究大豆异黄酮合成过程中相关基因时空表达特性,明确基因在高、低异黄酮含量大豆品种的表达差异,挖掘关键基因(酶),对于改良大豆异黄酮含量及赋予非豆类植物合成异黄酮的能力具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验材料为高异黄酮大豆品种中豆 27 和低异黄酮品种楚秀。2013 年 6 月种植于河北农业大学作物育种中心试验农场,3 次重复,2 行区,行长 2 m,行距 0.5 m,田间管理同一般大田管理方法。

1.2 试验方法

1.2.1 取样 按照大豆生育期划分标准^[13],分别于供试品种始花期(R1)、盛花期(R2)、始荚期(R3)、盛荚期(R4)、始粒期(R5)、鼓粒期(R6)、成熟初期(R7)与完熟期(R8)取样,取样部位包括叶片与子粒,样品放置于塑封袋,-80℃超低温冰箱保存。按照 3 个区组分别进行,每个区组选取大豆植株相同部位、发育进程相同的叶片或子粒 3 份。

1.2.2 供试品种子粒异黄酮含量测定 大豆植株成熟后,分 3 个区组分别收获种子,并采用岛津 Prominence LC-20A 型高效液相色谱系统(SHIMADZU, Japan)进行子粒异黄酮含量测定,色谱条件为:SHIMADZU VP-ODS 柱(4.6 mm × 150 mm),柱温 36℃,检测波长 254 nm,进样量 10 μL,流动相采用 7:3 的乙腈:超纯水,流速 0.3 mL/min,分析时间 30 min^[6]。

1.2.3 总 RNA 提取及 cDNA 合成 提取大豆叶片与子粒总 RNA,方法参照天根生化科技(北京)有限公司 RNAsimple Total RNA Kit 操作指南,琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量和浓度;cDNA 合成按照宝生物工程(大连)有限公司 PrimeScript RT Reagent Kit With gDNA Eraser(Perfect Real Time)操作指南进行。

1.2.4 大豆异黄酮代谢途径相关基因实时定量

PCR 分析 根据大豆异黄酮代谢途径^[14],选取 7 个相关基因苯丙氨酸解氨酶基因 PAL(GQ220305)、肉桂酸羟化酶基因 C4H(FJ770468)、4-香豆酸辅酶 A 连接酶基因 4CL(AF002259)、查尔酮合成酶基因 CHS(AY237728)、细胞色素还原酶基因 CPR(NM-001249044)、查尔酮异构酶基因 CHI(AY595415)、异黄酮合成酶基因 IFS(FJ770473)为研究对象,以组成型表达基因 Actin11 为内参,分别设计上述基因实时定量 PCR 引物(表 1),并通过扩增目的基因及测序技术确定引物的正确性。采用 SYBR[®] Green I 荧光染料法,参考黄方等^[15]、S. Derveaux 等^[16]方法进行供试基因实时定量 PCR 分析。供试基因在不同大豆品种叶片中的相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{基因}} - Ct_{\text{Actin11}})_{\text{品种1叶片}} - (Ct_{\text{基因}} - Ct_{\text{Actin11}})_{\text{品种2叶片}}$;基因在不同品种子粒中的相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{基因}} - Ct_{\text{Actin11}})_{\text{品种1子粒}} - (Ct_{\text{基因}} - Ct_{\text{Actin11}})_{\text{品种2子粒}}$ 。

1.2.5 数据分析方法 采用 Microsoft Excel 2010 对数据进行统计分析。

表 1 本研究所用异黄酮代谢途径相关基因实时定量 PCR 引物

Table 1 Primers for real-time quantitative PCR of genes related to isoflavone metabolism pathway in soybean

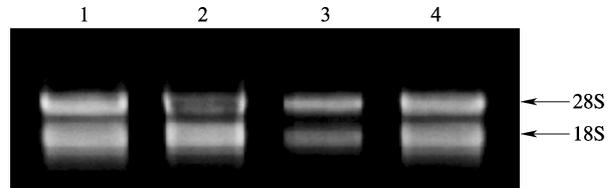
引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	扩增片段 长度(bp) Amplified fragment length
PAL-F	GACTCATAAACTAAAGCACCACCC	158
PAL-R	GTGAAGTCCTAAGAGCATAACGGT	
C4H-F	CAAGTGACTGAGCCAGACATCC	100
C4H-R	TGTGTGGTACAAGGAGAGGGATT	
4CL-F	AGGGATACGGAATGACTGAGGC	109
4CL-R	GCATTTCTTACAACGGTTCCACAT	
CHS-F	GGTTCTGACCCAATTCACAAGT	85
CHS-R	CACCTTCACTGTCTGGAGCAAT	
CHI-F	GAAGCCGAAGCAATAGACAAGTT	94
CHI-R	ATCCATTGGGTGAGACAGTGAAA	
IFS-F	CCGCAAGTTCCTTAGGGTTATG	175
IFS-R	GAGGCTGTATTCGCCGAAGAT	
CPR-F	CCTCATCTTGTCTTCTCTCTTT	170
CPR-R	ATGGATTCCCACACACCCTTC	
Actin11-F	ATCTTGACTGAGCGTGGTTATCC	126
Actin11-R	GCTGGTCTGCTGTCTCC	

2 结果与分析

2.1 供试大豆品种异黄酮含量分析及 cDNA 合成

通过分析中豆 27 与楚秀子粒异黄酮含量,结果发现,中豆 27 异黄酮含量为 3717.6 $\mu\text{g/g}$,楚秀异黄酮含量为 442.3 $\mu\text{g/g}$,二者差异达到极显著水平。随后分别提取中豆 27、楚秀不同发育时期叶片与子粒总 RNA,采用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。结果表明,提取 RNA 的 28S rRNA 与 18S rRNA 带型清晰,且 28S rRNA 亮度约为 18S rRNA 的 2 倍(图 1);经紫外分光光度计检测 RNA 发现, A_{260}/A_{280} 介于 1.8~2.0,表明总 RNA 质量高,无降解。以纯化后的各时期叶片与子粒总 RNA 为模板,采用反转录试剂盒获得 cDNA;利用大豆内参基因 *Actin11* 引物进行 RT-PCR 扩增,经琼脂糖凝胶电泳检

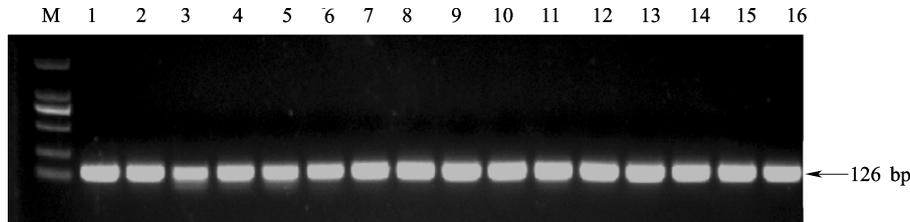
测,目的条带清晰,证明 cDNA 质量满足实时定量 PCR 要求(图 2)。分别采用表 1 中的 7 对实时定量 PCR 引物进行扩增,获得合适大小目的条带,回收目的条带后进行测序分析,结果发现与所扩增的目的基因相应片段序列一致,证明上述引物可用于 7 个基因的实时定量 PCR 分析。



1-4: Total RNA of soybean varieties in this study

图 1 供试大豆品种总 RNA 琼脂糖凝胶电泳检测

Fig.1 Total RNA electrophoresis detection results of soybean varieties



M: DNA Marker DL 2000; 1~16: *Actin11* 引物扩增供试品种 cDNA

M: DNA Marker DL 2000, 1-16: Amplification results of cDNA with *Actin11* primers

图 2 大豆内参基因 *Actin11* 引物扩增检测 cDNA 质量

Fig.2 Detection results of soybean cDNA by RT-PCR with *Actin11* primers

2.2 大豆异黄酮合成途径相关基因差异表达分析

2.2.1 苯丙氨酸解氨酶基因 *PAL* 差异表达 实时定量 PCR 分析高异黄酮大豆中豆 27 与低异黄酮楚秀中 *PAL* 的表达,结果表明不同发育时期,该基因在 2 个大豆品种叶片、子粒中的表达模式不同。在 R1~R7 期,中豆 27 与楚秀的 *PAL* 基因在叶片中的表达量在 R2 期差异最大,中豆 27 为楚秀的 3.4 倍,且差异达到极显著水平 ($P < 0.01$),而在

其他发育时期二者表达量差异相差倍数较小(图 3a),由此可见,R2 期可能是大豆异黄酮合成的关键时期,且 *PAL* 在该时期对于异黄酮合成具有重要作用。*PAL* 在 2 个品种 R5~R8 期子粒中的表达分析表明,该基因在 R7 期楚秀子粒中的表达量显著高于中豆 27,其差异可达 2.3 倍 ($P < 0.05$),而在其他时期 2 个品种子粒间的 *PAL* 表达量差异不显著(图 3b)。

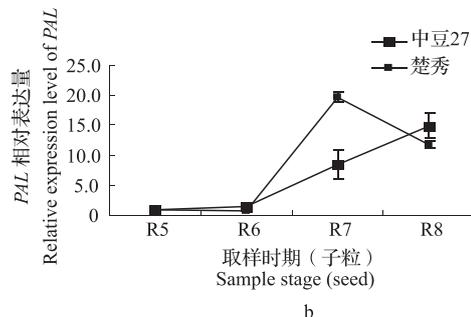
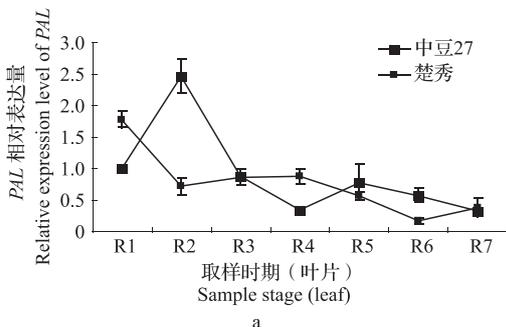


图 3 *PAL* 在不同大豆品种中的差异表达分析

Fig.3 Differential expression of *PAL* in different soybean varieties

2.2.2 肉桂酸羟化酶基因 *C4H* 的差异表达 *C4H* 在 2 个品种叶片中的表达模式存在较大差异。其中,该基因在中豆 27 的 R2 期表达量迅速增加,出现表达高峰,随后在 R3 期下降,直至 R5 期出现第 2 个表达高峰,随后继续下降直至 R7 期。而 *C4H* 基因在楚秀 R1 ~ R7 期的表达量始终没有出现表达高峰,除 R1、R4、R7 期外,其余时期均低于中豆 27 的 *C4H* 表达量,尤以 R2 期差异最大(2.9 倍),且达极

显著水平($P < 0.01$)(图 4a);该基因在 2 个大豆制品 R5 ~ R8 时期子粒中的表达模式基本相同,表达量差异在 R6 期达到极显著水平,而其余时期差异不显著(图 4b)。由于 *C4H* 是苯丙氨酸代谢途径中的第 2 个酶,控制着该代谢途径中的第 1 个氧化反应,催化肉桂酸合成对香豆酸,因此,该基因在中豆 27 叶片 R2 期的高效表达能够促进大豆品种异黄酮合成。

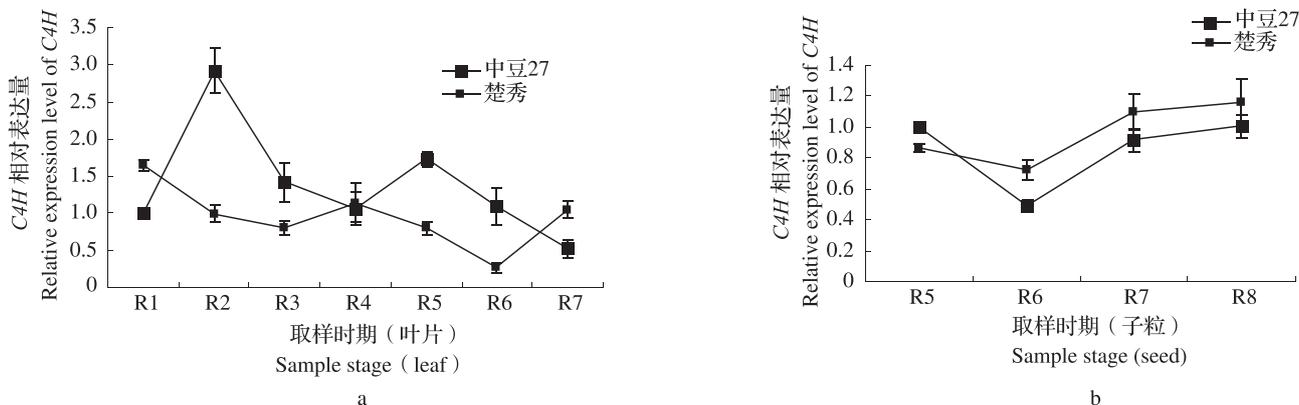


图 4 *C4H* 在不同大豆品种中的差异表达分析

Fig. 4 Differential expression of *C4H* in different soybean varieties

2.2.3 4-香豆酸辅酶 A 连接酶基因 *4CL* 的差异表达 4-香豆酸辅酶 A 连接酶基因 *4CL* 在中豆 27 的 R2 期叶片中表达量出现最高峰,约为楚秀品种的 4.8 倍,且差异达极显著水平($P < 0.01$),随后表达量迅速下降,而 *4CL* 在楚秀 R1 期的表达量最高,在

R2 ~ R7 期表达量反而下降(图 5a);该基因在中豆 27 与楚秀子粒中的变化趋势基本一致,从 R5 ~ R8 期,均呈现下降的趋势,且品种间的表达量在 R6 ~ R8 期差异均不显著(图 5b)。由此推测,*4CL* 基因主要在大豆叶片异黄酮合成过程中发挥重要作用。

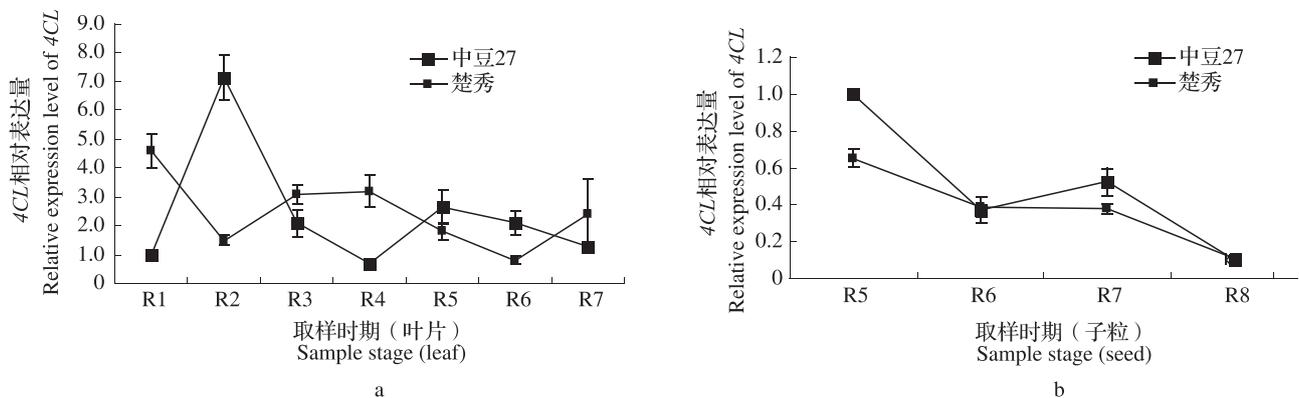
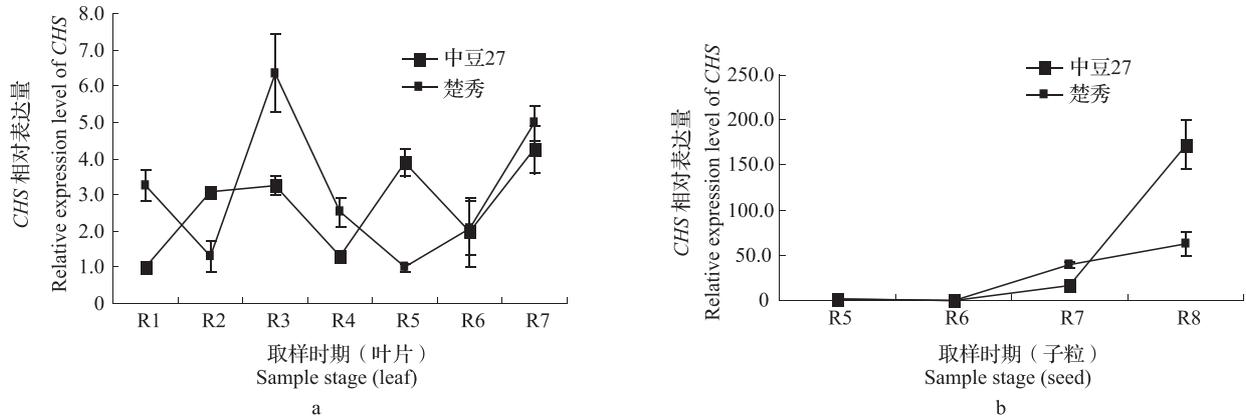


图 5 *4CL* 在不同大豆品种中的差异表达分析

Fig. 5 Differential expression of *4CL* in different soybean varieties

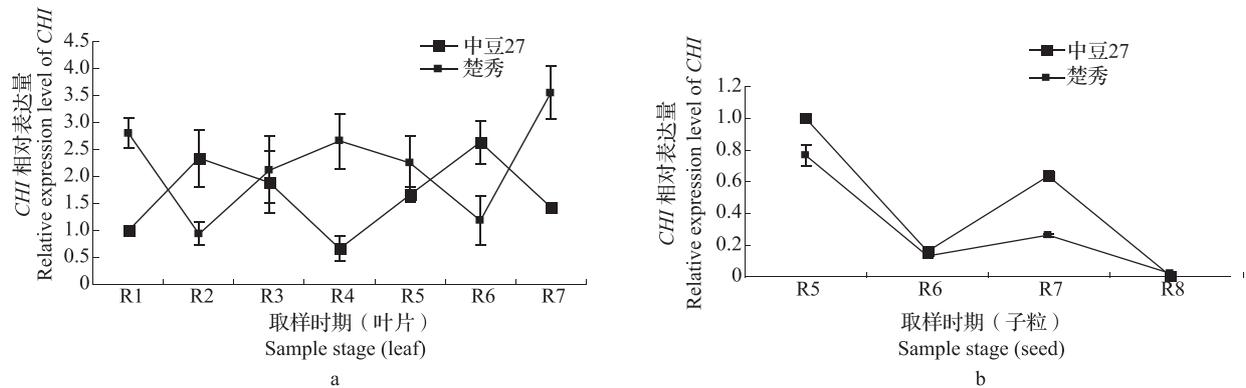
2.2.4 查尔酮合成酶基因 *CHS* 差异表达 查尔酮合成酶基因 *CHS* 在中豆 27 叶片中 R2 ~ R3 期出现表达高峰,R5 期出现第 2 个表达高峰,R7 期出现第 3 个表达高峰。在楚秀叶片中,*CHS* 基因表达量在 R2 期下降,R3 期达到表达量最大值,R4 ~ R5 期迅速下降,R6 ~ R7 期迅速上升(图 6a);在大豆子粒

中,R5 ~ R8 期,*CHS* 基因表达量逐步上升,R8 期达到最大值,且该时期中豆 27 的 *CHS* 基因表达量显著高于楚秀,差异达到 2.8 倍($P < 0.05$)(图 6b)。R5 ~ R8 期是大豆异黄酮由叶片转至子粒的关键时期,因此,*CHS* 基因在中豆 27 子粒中的高效表达显著提高了异黄酮在该品种中的积累水平。

图 6 *CHS* 在不同大豆品种中的差异表达分析Fig. 6 Differential expression of *CHS* in different soybean varieties

2.2.5 查尔酮异构酶基因 *CHI* 差异表达 *CHI* 在中豆 27 与楚秀叶片中的表达模式截然相反。在中豆 27 中, *CHI* 基因在 R2 期出现表达高峰, R3 期开始下降, R4 期降到初始水平, R5 期开始上升, R6 期出现第 2 个表达高峰, R7 期出现下降趋势。而在楚

秀叶片中, 该基因在 R1 期表达量较高, R2 期迅速下降, R3 期开始上升, R4 期出现第 2 个表达高峰, R5 期开始下降直至 R6 期(图 7a); *CHI* 基因在 2 个大豆品种子粒中的表达模式基本相同, R5 期表达量较高, R8 期表达量下降至最低(图 7b)。

图 7 *CHI* 在不同大豆品种中的差异表达分析Fig. 7 Differential expression of *CHI* in different soybean varieties

2.2.6 细胞色素还原酶基因 *CPR* 的差异表达 该基因在 2 个大豆品种叶片中的表达趋势基本相同, R1 ~ R7 期, *CPR* 表达量逐步升高, R7 期达到最高, 且楚秀中的表达量从 R1 ~ R4 期始终极显著高于中豆 27 ($P < 0.01$) (图 8a), 由此推测, *CPR* 基因在大豆叶片中的高效表达不利于异黄酮的合成与积累; 在中豆 27 子粒中, 从 R5 ~ R8 期, *CPR* 基因表达量没有明显变化, 始终维持较低的表达水平, 而在楚秀子粒中, *CPR* 基因表达量在 R5 ~ R6 期没有明显变化, 保持较低的表达水平, 但在 R7 ~ R8 期, *CPR* 基因表达量极显著高于中豆 27, 差异分别达到 85.8、36.0 倍 ($P < 0.01$) (图 8b), 说明 *CPR* 表达与异黄酮合成呈现负相关, 对异黄酮合成与积累具有明显抑制作用。

2.2.7 异黄酮合成酶基因 *IFS* 的差异表达 异黄酮合成酶基因 *IFS* 在中豆 27 与楚秀叶片中的表达模式相反。在中豆 27 叶片中, *IFS* 基因在 R2 期出现表达高峰, R3 期下降, R5 期出现第 2 个表达高峰。而在楚秀叶片中, R1 期表达量最高, R2 期迅速下降, R3 期出现第 2 个表达高峰, R4 期迅速下降直至 R6 期。由此可见, 在大豆异黄酮合成的 R2 与 R5 关键期, 中豆 27 的 *IFS* 表达量表现增高趋势, 而楚秀的 *IFS* 表达量却表现下降的趋势(图 9a); 在 R5 ~ R6 期, 2 个品种子粒中的 *IFS* 基因表达量均较低, 从 R7 期开始, *IFS* 基因表达量表现增高趋势, R8 期达到最高。并且, 中豆 27 在 R8 期的表达量极显著高于楚秀, 二者相差 3.0 倍 ($P < 0.01$) (图 9b)。由此可见, *IFS* 基因在子粒中的高效表达有利于大豆异黄酮合成与积累。

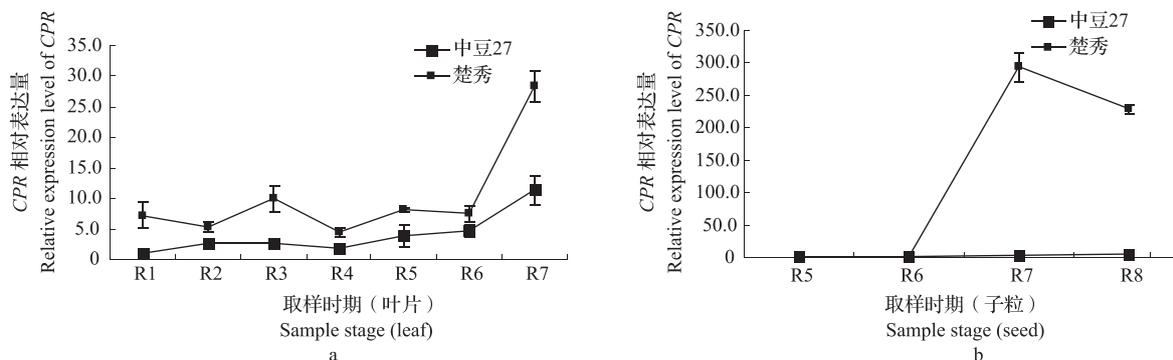


图8 CPR在不同大豆品种中的差异表达分析

Fig. 8 Differential expression of CPR in different soybean varieties

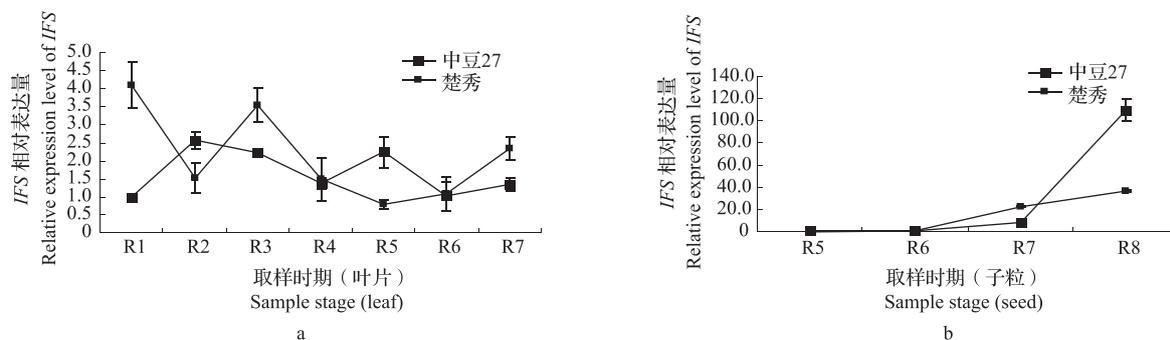


图9 IFS在不同大豆品种中的差异表达分析

Fig. 9 Differential expression of IFS in different soybean varieties

2.3 大豆异黄酮合成途径相关基因表达量相关性分析

通过分析大豆异黄酮合成途径中上述7个基因表达量之间的相关性,结果发现,在中豆27叶片中的PAL与C4H、4CL之间($r = 0.95, 0.99$),C4H与4CL、IFS之间($r = 0.93, 0.82$)的表达量相关系数均较高,且相关性达到显著或极显著水平,说明上述基因在大豆异黄酮合成过程中存在着紧密联系,由于它们共同的协同作用,使得中豆27子粒异黄酮含量得以积累和提高(表2)。

表2 异黄酮合成途径相关基因的表达量相关性分析

Table 2 The correlation analysis of soybean genes expression level associated with isoflavone synthesis

	PAL	C4H	4CL	CHS	CHI	CPR
C4H	0.95**					
4CL	0.99**	0.93**				
CHS	0.13	0.05	0.18			
CHI	0.51	0.43	0.58	0.13		
CPR	-0.37	-0.57	-0.29	0.60	-0.03	
IFS	0.75	0.82*	0.71	0.43	0.18	-0.41

3 讨论

苯丙烷途径与异黄酮合成途径共同组成了大豆

中的异黄酮代谢途径,在该途径中涉及到的相关酶类约有十几种,涉及到的相关基因可以达到几十个,且很多基因序列目前已在大豆中克隆注册^[17-18]。多年来,很多学者试图利用这些已有基因序列通过转基因途径提高大豆异黄酮含量,然而进展不尽人意^[19-21]。究其原因可能与大豆异黄酮代谢途径相关基因数量多、调控机制复杂(正调控、负调控)、基因功能大小不尽相同(主效基因、微效基因)等因素有关。因此,有学者提出,在已有研究基础上,分析苯丙烷途径和异黄酮合成途径相关基因表达差异,寻找该途径中发挥主要作用的关键酶类或基因,是实现大豆异黄酮含量提高的关键^[22]。

关于异黄酮代谢途径相关基因差异表达分析,前人已有研究报道。张大勇等^[23]通过分析大豆叶片中PAL表达量与异黄酮的关系,发现该基因表达量与异黄酮总含量及3种苷元组份含量的增减趋势表现一致,并在R1期出现表达高峰。练云等^[24]研究发现,IFS1基因在大豆授粉后25~45d的子粒、豆荚及花中的表达量较低,而在成熟胚中的表达量较高,故推测IFS1基因在大豆胚发育早期促进了异黄酮的积累。单丽伟等^[25]分析CHS1、CHS2、CHS3基因在不同品种中的表达差异,发现3个基因在品

种间的表达明显不同,且推测这可能是引起大豆品种间黄酮含量差异的重要原因。王艳等^[26]利用异黄酮含量不同的2个大豆品种研究相关基因表达差异,发现从营养生长到生殖生长阶段,*PAL*、*CHI*、*IFS*和*F3H*的相对表达量表现出增高趋势,*PAL*、*C4H*、*IFS*和*CHS*基因在叶片中的相对表达量高峰均出现在R1期,而大部分基因在2个品种豆荚中相对表达量差异显著时期为R6期。田玲等^[22,27]分析异黄酮代谢途径相关基因发现,*CHS7*、*CHS8*、*CHR*和*IFS2*相对表达量随大豆种子发育过程不断上升,故认为上调这些基因的表达可能促进异黄酮的积累;而*CHI1B1*的相对表达量可能对异黄酮的积累具有抑制作用。

本研究以高、低异黄酮含量大豆特异种质为材料,分析其叶片与子粒中的异黄酮代谢途径相关基因在品种间的表达差异,结果发现,在供试的7个相关基因中,*PAL*、*C4H*、*4CL*基因表达量在大豆生长发育的R2期叶片中品种间差异较大,且高异黄酮大豆中的表达量显著高于低含量品种;而*CHS*、*IFS*、*CPR*表达量则在R8期子粒中品种间差异较大。由此可见,R2、R8期对于大豆异黄酮合成及积累非常关键。同时发现,叶片中的*PAL*、*C4H*、*4CL*、*CPR*基因,子粒中的*PAL*、*CHS*、*CPR*、*IFS*基因在高、低异黄酮大豆品种间的表达差异较大,说明这些基因在异黄酮合成与积累过程中具有重要作用,且*PAL*、*C4H*、*4CL*、*IFS*、*CHS*基因的高效表达有利于异黄酮含量的积累,而*CPR*基因的低表达有利于异黄酮合成与积累。这与田玲等^[22]报道的*CHS*、*IFS*上调表达有利于异黄酮积累、练云等^[24]关于*IFS*表达量的结果一致,同时与王艳等^[26]报道的从营养生长到生殖生长阶段*PAL*、*IFS*相对表达量逐渐升高以及张大勇等^[23]关于*PAL*表达量的结果一致。因此推断,如果育种者能够在大豆R2、R8发育阶段,采用现代生物技术手段(如构建串联基因簇、多个目的基因共转化等)或其他栽培管理措施提高*PAL*、*C4H*、*4CL*、*CHS*、*IFS*表达量,或降低*CPR*表达量,则可能实现异黄酮含量的提高。鉴于此,笔者所在课题组目前正在尝试采用多基因共转化的方式来提高大豆子粒异黄酮含量的研究。

参考文献

- [1] Hsieh H C, Kao T H, Chen B H. A fast HPLC method for analysis of isoflavones in soybean [J]. *J Liq Chromatogr R T*, 2005, 27(2): 315-324
- [2] Chiari L, Piovesan N D, Naoe L K, et al. Genetic parameters rela-

- ting isoflavone and protein content in soybean seeds [J]. *Euphytica*, 2004, 138(1): 55-60
- [3] Liu R R, Hu Y L, Li J L, et al. Production of soybean isoflavone genistein in non-legume plants via genetically modified secondary metabolism pathway [J]. *Metab Eng*, 2007, 9(1): 1-7
- [4] 袁凤杰, 姜莹, 董德坤, 等. 中国大豆核心种质异黄酮含量的分析[J]. *中国粮油学报*, 2011, 26(2): 5-8
- [5] 葛一楠, 孙君明, 韩粉霞, 等. 代表性大豆种质异黄酮主要组分含量鉴定[J]. *植物遗传资源学报*, 2011, 12(6): 921-927
- [6] 崔艳伟, 李喜焕, 李文龙, 等. 黄淮海大豆异黄酮含量分析与特异种质遴选[J]. *植物遗传资源学报*, 2013, 14(6): 1167-1172
- [7] Trantas E, Panopoulos N, Ververidis F. Metabolic engineering of the complete pathway leading to heterologous biosynthesis of various flavonoids and stilbenoids in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Metab Eng*, 2009, 11(6): 355-366
- [8] Dixon R A, Chen F, Guo D, et al. The biosynthesis of monolignols: a "metabolic grid", or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? [J]. *Phytochemistry*, 2001, 57(7): 1069-1084
- [9] 陈宣钦, 张乐, 徐慧妮, 等. 大豆异黄酮生物合成关键酶及其代谢工程研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2012, 32(7): 133-138
- [10] 唐寅, 张威威, 许锋, 等. 植物苯丙氨酸代谢相关酶基因启动子研究进展[J]. *长江大学学报*, 2010, 7(2): 68-71
- [11] Tuteja J, Jigyasa H, Vodkin, et al. Structural features of the endogenous silencing and target loci in the soybean genome [J]. *Crop Sci*, 2008, 48(2): S49-S68
- [12] Jiang N, Jeon E H, Pak J H, et al. Increase of isoflavones in soybean callus by *Agrobacterium*-mediated transformation [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2010, 4(4): 253-260
- [13] 王连铮, 郭庆元. 现代中国大豆[M]. 北京: 金盾出版社, 2007: 57-58
- [14] Gutierrez-Gonzalez J J, Guttikonda S K, Lam-Son Phan T, et al. Differential expression of isoflavone biosynthetic genes in soybean during water deficits [J]. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51(6): 936-948
- [15] 黄方, 何慧, 迟英俊, 等. 大豆 *GmTINY1* 基因的克隆与表达分析[J]. *作物学报*, 2009, 35(12): 2174-2179
- [16] Derveaux S, Vandesompele J, Hellemans J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR [J]. *Methods*, 2010, 50(4): 227-230
- [17] 王安娜, 王婵婵, 吴蕾, 等. 大豆 *C4H* 基因克隆及生物信息学分析[J]. *东北农业大学学报*, 2010, 41(4): 12-15
- [18] 牛天敏, 马会勤, 陈尚武. 大豆查尔酮合成酶(*CHS*)基因的克隆、表达及其在雪莲提取液中的代谢产物分析[J]. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(2): 58-63
- [19] 钱丹丹, 龚德顺, 焦丽, 等. 大豆异黄酮合成关键酶基因的克隆及表达分析[J]. *大豆科学*, 2011, 30(5): 743-748
- [20] 夏循礼, 杨广笑, 何光源. 大豆异黄酮生物合成串联基因簇及其表达载体的构建[J]. *大豆科学*, 2009, 28(1): 7-10
- [21] 郝佳, 马会勤, 代茹, 等. 大豆异黄酮代谢途径在大肠杆菌中的构建及表达[J]. *生物工程学报*, 2007, 23(6): 1022-1028
- [22] 田玲, 李斌, 张晶莹, 等. 大豆子粒发育过程中异黄酮合成相关酶基因的表达模式与异黄酮积累的相关分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2014, 15(6): 1295-1304
- [23] 张大勇, 李文滨, 李冬梅, 等. 大豆叶片异黄酮含量与 *PAL* 基因相对表达量的关系[J]. *大豆科学*, 2009, 28(4): 670-673
- [24] 练云, 李海朝, 王树峰, 等. 大豆异黄酮生物合成途径中 *IFS1* 基因表达分析[J]. *华北农学报*, 2013, 28(3): 25-29
- [25] 单丽伟, 汪勇, 王美玲, 等. 大豆类黄酮生物合成关键酶 *CHS* 基因的克隆及表达分析[J]. *西北植物学报*, 2012, 32(11): 2164-2168
- [26] 王艳, 武林, 孙梦阳, 等. 不同生育时期大豆异黄酮合成相关酶基因表达的分析[J]. *大豆科学*, 2012, 31(6): 887-893
- [27] 田玲. 调控大豆异黄酮合成相关转录因子基因的克隆与表达模式分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2014: 49-50