

大豆异黄酮还原酶基因的鉴定及生物信息学分析

张古文, 刘娜, 冯志娟, 徐盛春, 胡齐赞, 龚亚明

(浙江省农业科学院 蔬菜研究所, 浙江 杭州 310021)

摘要: 异黄酮是大豆生长过程中形成的一类次级代谢产物, 是大豆主要的功能活性成分之一。异黄酮还原酶(isoflavone reductase, IFR)是异黄酮分解途径的关键酶之一, 在调控异黄酮含量及成分方面起着重要作用。本研究基于大豆全基因组测序数据, 利用生物信息学方法鉴定了大豆异黄酮还原酶基因家族成员, 并对其基因的序列特征、结构特征和遗传多样性进行了分析。结果表明: 大豆异黄酮还原酶(GmIFR)家族含有17个成员, 蛋白序列介于191(GmIFR07)和376(GmIFR11)个氨基酸之间, 序列相似性为19.59%(GmIFR07和GmIFR11)~98.43%(GmIFR12和GmIFR17), 结构分析表明这些基因内含子数目差异较大, 2~6个不等, 不均匀的分布在大豆的1、4、6、9、11、12和16号染色体上。

关键词: 大豆; 异黄酮; 异黄酮还原酶; 基因家族

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.11861/j.issn.1000-9841.2016.06.0911

Identification and Bioinformatics Analysis of Isoflavone Reductase Genes in Soybean

ZHANG Gu-wen, LIU Na, FENG Zhi-juan, XU Sheng-chun, HU Qi-zan, GONG Ya-ming

(Institute of vegetables, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract: Isoflavones are a class of secondary metabolites formed in soybean growth, which are the main functional active components of soybean. Isoflavone reductase is one of the key enzymes catalyzed isoflavone decomposition and plays an important role in the regulation of isoflavone content and composition. In this research, we investigated the isoflavone reductase (IFR) gene family based on the results of soybean whole genome sequencing and analyzed the conservation of the sequence, sequence characteristics, structural features, genetic diversity as well as their phylogenetic relationships. The result showed that there were 17 gene members at least existed in the soybean genome with protein sequence length varying from 191 to 376. Sequence identity analysis showed that the lowest value of sequence similarity was observed between GmIFR07 and GmIFR11 (19.59%) and the highest value was observed between GmIFR12 and GmIFR17 (98.43%). Gene structure analysis showed the number of introns among these genes was ranging from 2 to 6. Moreover, these IFR gene family members distribute in chromosome 1, 4, 6, 9, 11, 12 and 16 in soybean unequally.

Keywords: Soybean; Isoflavone; Isoflavone reductase; Gene family

异黄酮是大豆中含有多个酚羟基的一类多酚化合物的总称, 属于植物雌激素, 是大豆主要的功能活性成分之一^[1]。近年来的研究发现大豆异黄酮对人类多种疾病包括肿瘤、骨质疏松症、心血管疾病、糖尿病、妇女更年期综合征、肾病和早老性痴呆症等的预防和治疗起着重要作用^[2]。另外, 大豆异黄酮在人体抗氧化、抗辐射以及增强免疫力方面也起着积极作用, 是天然的癌症预防剂, 引起了国内外研究人员的广泛关注^[3]。

植物体内各物质的含量主要受合成和分解两个途径共同调节。在异黄酮方面, 目前已经克隆了

部分与合成相关的基因, 并对其时空表达规律进行了研究, 但有关分解方面的研究报道不多^[4-6]。异黄酮还原酶催化异黄酮转变为美迪紫檀素, 是异黄酮分解途径的第一步, 也是关键一步^[7-8]。自然界中, 异黄酮仅存在于豆科蝶形花亚科的极少数植物中, 人体摄入的异黄酮几乎全部来自大豆, 因此大豆在异黄酮研究中具有重要地位^[9-10]。目前该酶基因在拟南芥、烟草、甘蔗和银杏中已经有了初步的克隆, 但得到的片段尚不是真正的基因序列, 而是其同源片段, 统称为类似异黄酮还原酶, 因此开展异黄酮还原酶研究对深入探究异黄酮的分解途

收稿日期: 2016-08-02

基金项目: 浙江省重大科技专项(2012C12903-4-1); 浙江省植物有害生物防控重点实验室—省部共建国家重点实验室培育基地项目(2010DS700124-KF1611); 浙江省公益技术应用研究计划项目(2015C32050)。

第一作者简介: 张古文(1981-), 男, 博士, 主要从事菜用大豆遗传育种和分子标记开发研究。E-mail: zhangguwen@126.com。

通讯作者: 龚亚明(1969-), 男, 研究员, 主要从事菜用豆类育种和推广工作。E-mail: gongym07@126.com。

径意义重大^[11-13]。2010年,大豆基因组测序完成,为从事大豆基础研究和育种研究的人员提供了海量的数据,也使得在全基因组水平上深入研究这一重要作物成为可能^[14]。本文利用生物信息学方法鉴定大豆基因组中的全部 *IFR* 基因家族基因,从基因组水平上了解和掌握其结构特点、染色体定位和遗传进化关系,以期为进一步的功能分析提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆 *IFR* 基因序列和蛋白序列下载于 <http://soybase.org> 和 <http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html> 两个数据库。

1.2 方法

1.2.1 大豆 *IFR* 基因家族成员的鉴定 为鉴定大豆异黄酮还原酶基因家族成员,共采用了两种方法:(1)利用关键词“Isoflavone reductase”搜索大豆基因组数据库(<http://soybase.org/>)并获得相关序列;(2)利用拟南芥 *IFR* 基因的保守序列在数据库(<http://www.phytozome.net/search.php>)进行 Blast 搜索,手工剔除重复的序列,利用 PFAM 在线工具(<http://pfam.janelia.org/>)进一步分析结构域,去除无典型结构域的序列,最终获得所有 *IFR* 基因。

1.2.2 大豆 *IFR* 基因家族成员遗传多样性、保守结构域及多序列比对分析 将大豆 *IFR* 基因的核苷酸序列用软件 BioXM 2.6 翻译为氨基酸序列,并保存为 FASTA 格式,用 DNASTar 的 MegAlign 程序计算核苷酸和氨基酸序列相似度;保守性结构域和序列比对方面,把 FASTA 格式的氨基酸序列导入 Clustal X 程序,经过初步转化后再导入 BioEdit 程序进行分析。

1.2.3 大豆 *IFR* 基因家族成员基因结构分析、染色体分布及系统发育树构建 通过 Clustal X 软件进行大豆 *IFR* 基因蛋白多序列比对;利用 GSDS 在线工具(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)制作基因外显子-内含子结构图;利用 MapDraw V 2.1 软件绘制各基因在染色体上的分布图;通过 Clustal X 程序对大豆 *IFR* 蛋白进行多序列联配分析,联配结果使用 MEGA 5.0 软件(<http://megasoftware.net>),采用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统进化树,bootstrap 值设置为 1 000。

2 结果与分析

2.1 大豆 *IFR* 基因家族的鉴定

通过 Blast 比对和 PFAM 鉴定,大豆基因组共存在 17 个 *IFR* 基因,分别被命名为 *GmIFR01*-*GmIFR17*。17 个家族成员的核苷酸序列长度为 576 bp (*GmIFR07*) ~ 1 131 bp (*GmIFR11*) 之间;编码蛋白最短有 191 个氨基酸残基(*GmIFR07*),最长有 376 个氨基酸残基(*GmIFR11*);分子量变化与蛋白序列相似,最小的 *GmIFR07* 为 21.85 kDa,最大的 *GmIFR11* 为 41.86 kDa;等电点的变化幅度较大,最大的 *GmIFR11* 达到 8.50,最小的 *GmIFR09* 仅为 5.09;其它具体信息详见表 1。

2.2 大豆 *IFR* 基因家族成员的遗传多样性分析

由表 2 可知,在核苷酸水平上,大豆 *IFR* 基因家族成员间的相似水平为 24.27% ~ 96.34%,在氨基酸水平上,其相似性水平为 19.59% ~ 98.43%。与此同时,物理性质方面分析发现,*GmIFR07*、*GmIFR11* 和 *GmIFR14* 这 3 个成员为碱性蛋白,*GmIFR16* 为中性蛋白,其余皆为酸性蛋白。*GmIFR07* 和 *GmIFR11* 同为碱性蛋白,但同源性最低,且 *GmIFR07* 没有 5' 和 3' 非编码区,表明该基因很可能经历了一些特殊的扩增时间,具有特殊而独特的作用,同时结构差异暗示该家族的最初成员应该为酸性蛋白,碱性成员是后来的突变蛋白。

2.3 大豆异黄酮还原酶蛋白保守结构域分析及多序列比对

为揭示大豆异黄酮还原酶蛋白的结构特征,对其结构域进行了分析,并对其氨基酸序列进行了多重序列比对(图 1)。结果表明,大豆异黄酮还原酶属于短链脱氢酶(SDR)家族,具有该家族典型的结构特征。17 个成员中,除 *GmIFR07* 在 N 端发生了缺失外,其余的家族成员氨基酸序列均具有较高的保守性;除 *GmIFR07* 外,其余成员均含有 NADP 结合位点的典型结构域“GXXGXXG”;除 *GmIFR08* 外,其余成员均含有 C 末端保守催化位点“TXXXXL”;除 *GmIFR13*、*GmIFR14*、*GmIFR06*、*GmIFR07*、*GmIFR09* 的活性中心为“FXXN”外,其余成员均具有 SDR 酶家族的活性中心“YXXN”;另外,位于 NADP 结构域下游的 Asn²⁵、Ser²⁶,活性位点上游的 Tyr¹⁸⁰、下游的 Lys¹⁹⁵ 以及决定底物特异性

的 Lys⁷²、Asn¹¹⁶等氨基酸残基都具有极高的保守性。

2.4 大豆 *IFR* 基因家族成员的外显子和内含子分析

外显子和内含子分析主要是为了探究基因的表达模式。由图2可以看出,大豆 *IFR* 基因家族成员含有的内含子数目为2~6,变异幅度不是很大。其中,数目最多的 *GmTFR13*、*GmTFR14* 和数目最少的 *GmTFR07* 有1个共同点是都不含有5'和3'非编码区(5'-UTR和3'-UTR);剩余的14个成员都含有5'-UTR和3'-UTR,其中,11个成员含有4个内含子,3个成员含有3个内含子。另外,家族成员间内含子的长度也存在较大的差异,比如 *GmTFR02*、*GmTFR10* 和 *GmTFR15* 各含有1个超长内含子, *GmTFR06*、*GmTFR08*、*GmTFR13* 和 *GmTFR14* 各含有1~2个中等长度的内含子,其余家族成员的内含子

均较短。

2.5 大豆 *IFR* 基因家族成员的染色体定位

根据大豆基因组的信息,得到了17个 *IFR* 基因在大豆染色体上的定位图。由图3可知,17个家族成员中,16和17号成员尚未定位到染色体上,其余的15个成员不均匀的分布于大豆第1、4、9、11、12、15、16号染色体上。第1号染色体含有4个家族成员,第4和11号染色体含有3个成员,第6号染色体上含有2个成员,第9、12和16号染色体上分别含有1个成员。其中,第1、4、11号染色体分别含有紧密连锁的基因,表明其可能属于串联重复。另外,15个定位到染色体上的家族成员中,有7个分布于染色体两端,8个分布于染色体中间,其中5个位于正中间,表明该家族基因的扩增并非主要来自片段重复。

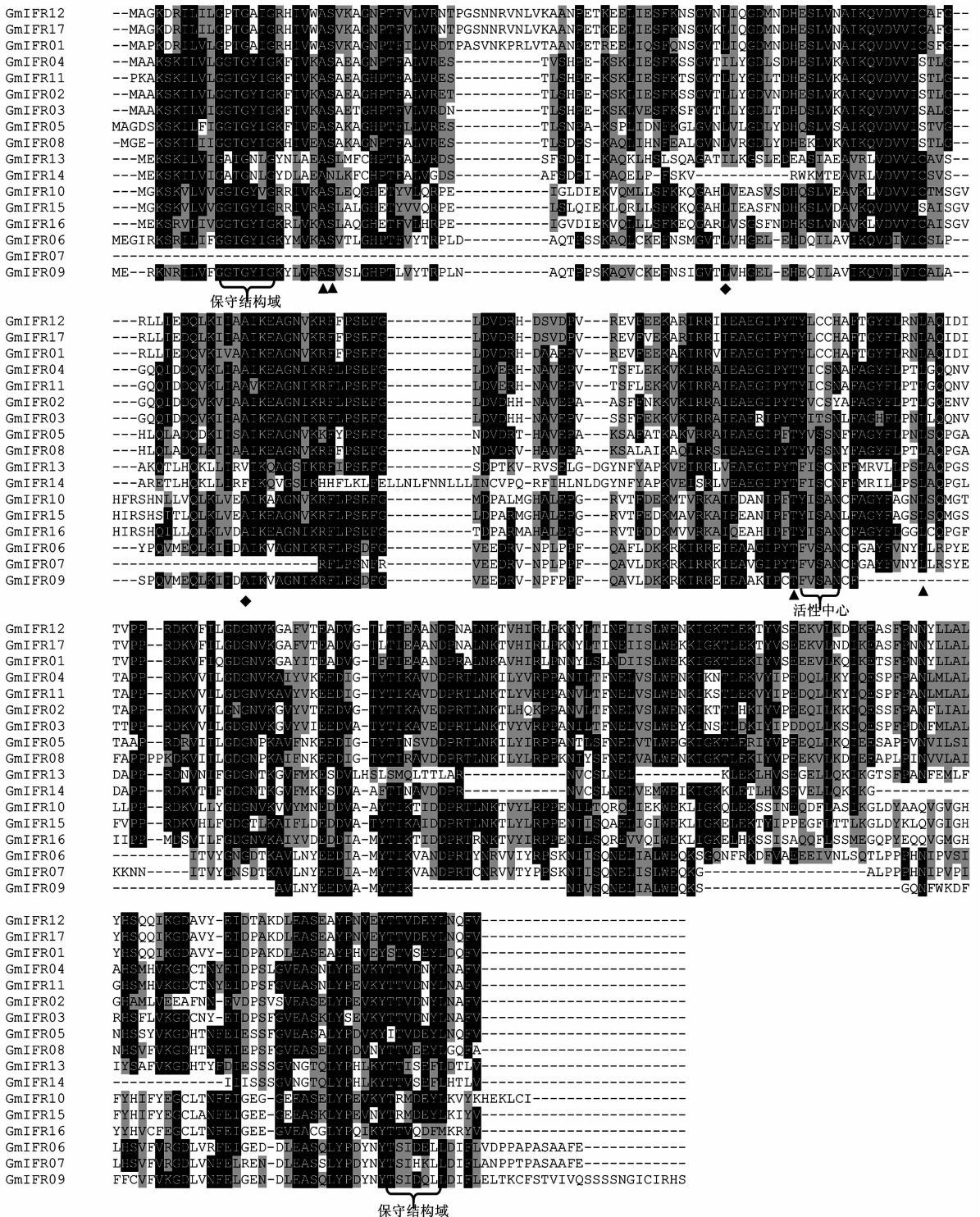
表1 大豆异黄酮还原酶(*IFR*)基因家族成员

Table 1 Isoflavone reductase(*IFR*) gene families in soybean

基因 Gene	SGN 位点 SGN locus	染色体 Chromosome	内含子数目 Number of intron	氨基酸长度 Predicted protein length	分子量 Molecular weight	理论等电点 Isoelectric point
<i>GmIFR01</i>	Glyma01g37810	1	4	318	35.58	5.13
<i>GmIFR02</i>	Glyma01g37820	1	4	307	33.77	6.32
<i>GmIFR03</i>	Glyma01g37840	1	4	307	34.28	6.41
<i>GmIFR04</i>	Glyma01g37850	1	4	308	34.00	6.38
<i>GmIFR05</i>	Glyma04g01380	4	4	310	33.94	5.68
<i>GmIFR06</i>	Glyma04g16270	4	4	322	36.34	5.09
<i>GmIFR07</i>	Glyma04g16290	4	2	191	21.85	8.17
<i>GmIFR08</i>	Glyma06g03410	6	4	310	34.22	5.94
<i>GmIFR09</i>	Glyma06g47450	6	5	276	31.23	5.20
<i>GmIFR10</i>	Glyma09g34470	9	3	318	35.65	6.61
<i>GmIFR11</i>	Glyma11g07490	11	5	376	41.86	8.50
<i>GmIFR12</i>	Glyma11g07510	11	4	318	35.53	5.14
<i>GmIFR13</i>	Glyma11g12440	11	6	288	31.69	6.88
<i>GmIFR14</i>	Glyma12g04660	12	6	272	30.57	7.93
<i>GmIFR15</i>	Glyma16g17680	16	3	312	34.93	6.81
<i>GmIFR16</i>	Glyma0317s00200	scaffold_317	3	312	34.95	7.05
<i>GmIFR17</i>	Glyma1454s00200	scaffold_1454	4	318	35.51	5.47

表2 大豆 *IFR* 基因家族成员的核苷酸和氨基酸序列相似性Table 2 Nucleotide and amino acid sequences similarity of soybean *IFR* gene families

基因 Gene	核苷酸/氨基酸序列相似性 Similarity of nucleotide and amino acid sequence/%															
	<i>GmIFR02</i>	<i>GmIFR03</i>	<i>GmIFR04</i>	<i>GmIFR05</i>	<i>GmIFR06</i>	<i>GmIFR07</i>	<i>GmIFR08</i>	<i>GmIFR09</i>	<i>GmIFR10</i>	<i>GmIFR11</i>	<i>GmIFR12</i>	<i>GmIFR13</i>	<i>GmIFR14</i>	<i>GmIFR15</i>	<i>GmIFR16</i>	<i>GmIFR17</i>
<i>GmIFR01</i>	68.76/ 59.12	69.28/ 57.23	70.10/ 58.62	61.18/ 52.96	47.80/ 35.59	29.27/ 20.00	60.25/ 55.45	39.53/ 24.85	49.95/ 38.97	56.70/ 47.55	89.13/ 86.79	49.79/ 36.45	43.27/ 30.94	50.26/ 42.46	51.30/ 38.58	89.86/ 86.79
<i>GmIFR02</i>		87.99/ 80.78	88.78/ 83.44	65.74/ 64.19	47.53/ 39.70	31.53/ 20.78	64.74/ 64.19	40.06/ 29.01	50.73/ 44.20	72.50/ 69.15	68.34/ 60.06	51.45/ 39.03	42.11/ 30.65	52.23/ 45.37	53.40/ 43.77	68.03/ 59.75
<i>GmIFR03</i>			89.01/ 83.77	66.92/ 64.52	48.09/ 41.39	30.27/ 23.13	64.09/ 62.90	39.43/ 29.01	52.86/ 46.25	72.68/ 69.41	68.97/ 58.18	52.20/ 40.32	43.03/ 30.97	54.49/ 48.41	55.45/ 47.13	68.86/ 57.86
<i>GmIFR04</i>				67.45/ 67.74	48.39/ 40.79	30.08/ 23.75	66.56/ 69.68	42.06/ 28.00	52.75/ 46.25	77.45/ 78.19	69.48/ 59.56	51.98/ 40.97	43.68/ 30.55	53.81/ 48.09	55.56/ 47.45	69.27/ 58.93
<i>GmIFR05</i>					50.35/ 41.69	29.37/ 22.98	70.52/ 78.21	38.27/ 26.15	51.39/ 44.72	56.59/ 56.65	60.14/ 55.14	53.23/ 40.71	45.43/ 34.29	53.98/ 46.52	54.24/ 45.89	60.35/ 54.52
<i>GmIFR06</i>						52.80/ 50.00	51.94/ 45.35	58.36/ 61.18	48.71/ 36.01	42.31/ 34.96	48.00/ 37.06	42.78/ 28.22	39.43/ 21.92	46.98/ 35.42	48.47/ 36.90	47.76/ 37.35
<i>GmIFR07</i>							29.70/ 26.09	36.83/ 23.22	28.00/ 20.68	24.27/ 19.59	28.32/ 19.70	29.53/ 17.16	31.97/ 16.33	28.63/ 21.60	28.56/ 20.06	28.71/ 19.70
<i>GmIFR08</i>								38.75/ 33.13	52.32/ 45.03	53.56/ 56.61	61.39/ 58.26	52.61/ 41.99	47.02/ 37.77	52.05/ 48.73	53.84/ 46.52	61.80/ 57.63
<i>GmIFR09</i>									38.20/ 29.66	37.72/ 24.60	40.32/ 25.60	39.98/ 24.84	38.34/ 19.47	37.99/ 25.90	39.64/ 27.88	40.32/ 25.60
<i>GmIFR10</i>										43.53/ 38.40	50.05/ 39.88	44.76/ 35.31	42.38/ 27.67	75.97/ 75.16	67.19/ 69.18	50.46/ 40.18
<i>GmIFR11</i>											56.87/ 48.58	43.10/ 34.39	33.27/ 26.39	43.74/ 39.53	45.69/ 39.01	57.22/ 48.06
<i>GmIFR12</i>												49.28/ 34.27	43.26/ 26.73	52.30/ 43.08	51.38/ 39.81	96.34/ 98.43
<i>GmIFR13</i>													74.97/ 59.53	45.56/ 34.08	46.66/ 35.99	48.96/ 34.27
<i>GmIFR14</i>														44.78/ 27.24	43.29/ 31.35	43.32/ 28.89
<i>GmIFR15</i>															68.90/ 69.87	53.01/ 43.08
<i>GmIFR16</i>																50.57/ 40.12



黑色三角代表保守氨基酸位点;黑色菱形代表决定底物特异性的 Lys 和 Asn 残基。

Filled triangle indicates conserved amino acid residues; Filled diamond indicated the Lys and Asn of substrate specificity.

图 1 大豆 IFR 基因家族成员的氨基酸序列比对

Fig. 1 The multiple sequence alignment of soybean IFR gene family members

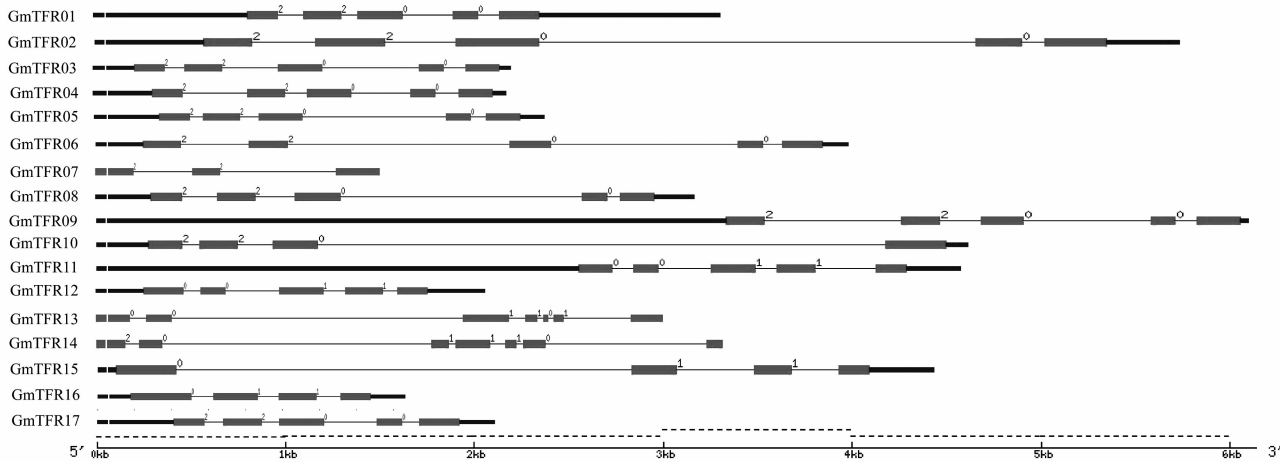


图2 大豆 *IFR* 基因家族成员的内含子 - 外显子结构

Fig. 2 The intron-exon structure of soybean *IFR* gene family members

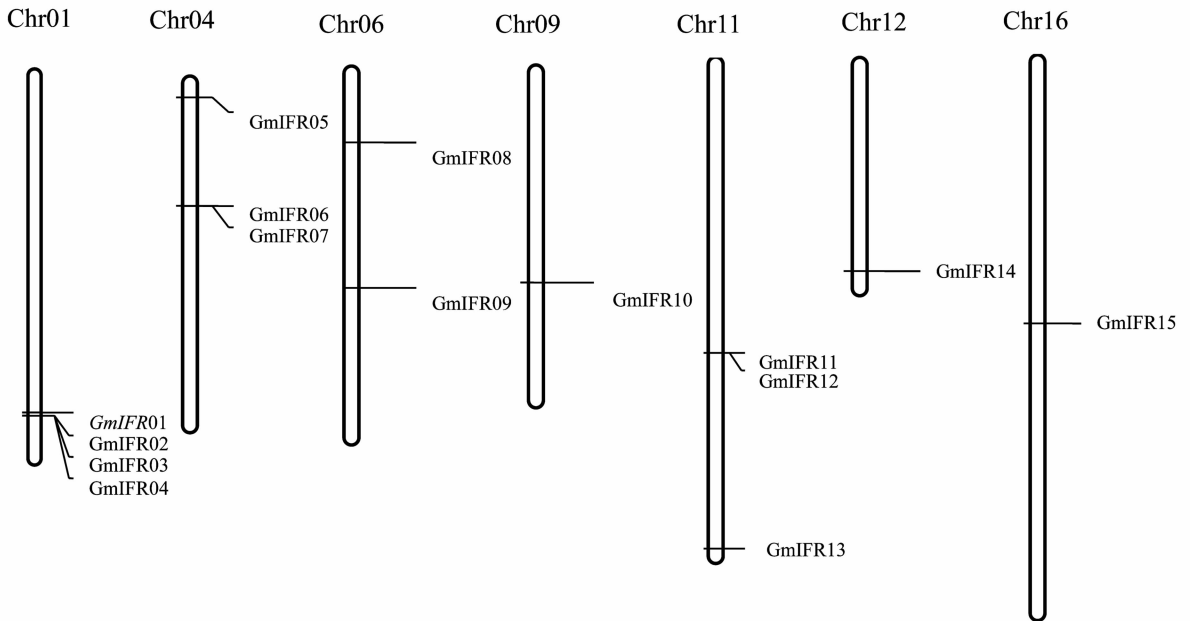


图3 大豆 *IFR* 基因家族成员在染色体上的分布

Fig. 3 Distribution of *IFR* gene family members in soybean chromosomes

2.6 大豆 *IFR* 基因家族成员的系统发育关系

为了分析大豆 *IFR* 基因家族的进化关系,构建了其系统发育树(图4)。结果显示,这些基因家族成员被分为2个家族,且家族成员数目差异巨大,两个家族之间的区别为第二家族成员不含N端和C端非编码序列。其中,第一家族又可进一步分为两个亚家族,两者之间的区别为在染色体上的位置不同;第一亚家族成员均处于染色体两端,发生交换

的几率大,保守率低,第二亚家族成员均处于染色体中间,发生交换的几率较小,保守率高。另外,在第一家族中,基因3'和5'端非编码区长短不一,内含子数目和长度也差异很大,表明家族成员在进化上产生了较多的丢失与扩增事件,基因的功能更容易歧化,暗示了其基因表达与功能的多样化;第二家族中,家族成员内含子数目和长度差异不大,结构也相似,表明其变异的幅度少,保守性高。

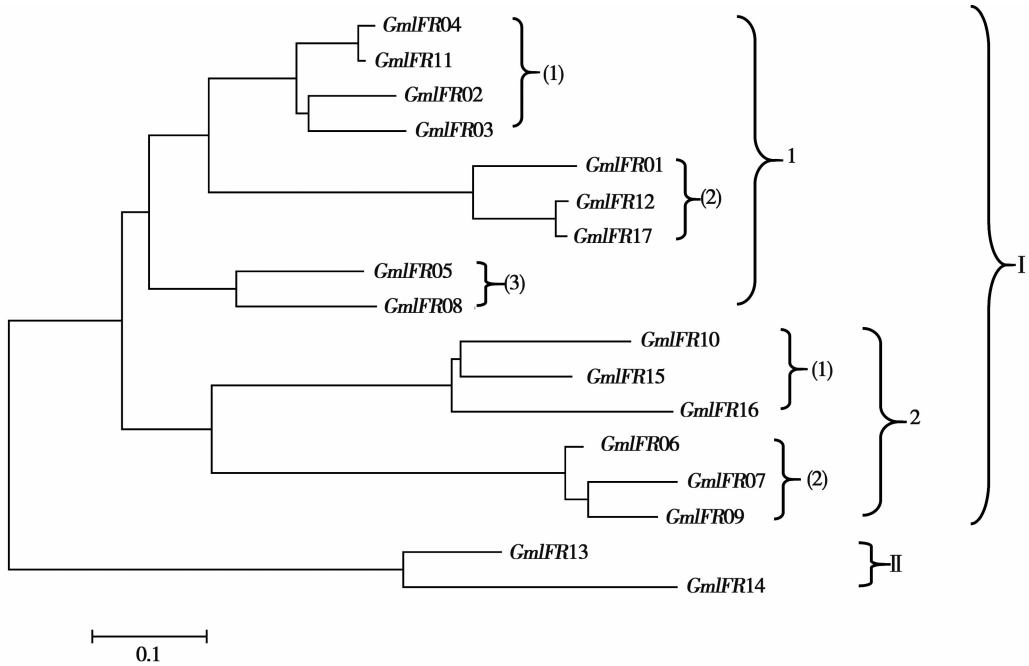


图4 大豆 *IFR* 基因家族成员的系统进化分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of soybean *IFR* gene family members

3 讨论

近年来,随着植物基因组测序工作的快速发展,植物学的研究已经进入了后基因组时代,基于整体的方法,改变了单个基因的研究模式,将基因组学研究带入了高速发展的时代^[15-16]。自然界中,异黄酮仅存在于豆科蝶形花亚科的极少数植物中,人体摄入的异黄酮几乎全部来自大豆,因此鉴定和分析大豆中异黄酮还原酶家族成员对研究异黄酮的分解代谢具有重要意义^[17]。2010年,大豆基因组全序列的公布,使得在全基因组水平上研究这一重要作物成为可能^[14]。本研究以拟南芥异黄酮还原酶基因序列为探针,从大豆基因组数据库中鉴定出17个异黄酮还原酶家族成员,分析结果表明其成员可明显的分为两类,且成员数目差异巨大,表明其成员分布的不均匀性,另外,其家族成员在基因结构、染色体位置和基因功能也均存在较大差异,表明其表达模式与功能的多样化,为进一步的功能分析提供良好基础。

生物进化的本质是基因的进化。一个物种性状保持不变,是因为控制这个物种的基因具有良好的保守性,与此同时,随着环境的改变,一些基因的结构、位置将会发生改变,称为突变,在基因突变的过程中,不同的环境和不同的积累,会导致基因朝不同的方向进化^[18]。本研究中,大豆异黄酮还原酶家族17个家族成员中,约有1/3成员存在着保守基序缺失,这表明在大豆中,该基因家族在进化过程中发生过严重的基因重组或突变事件^[19]。另外,结构分析结果表明,各基因在染色体上的位置、基因结构、表达模式和酸碱性质方面均存在较大的差异,

进一步表明该基因家族是一个古老的家族,其功能具有较高的保守性;但重组或突变的产生,增加了序列丢失与扩增事件发生的概率,基因的功能更容易歧化,导致家族成员结构的多样性功能以及功能的复杂性^[20]。

基因变异的来源是突变和重组,其中,重组是植物基因家族进化过程中的最重要机制之一,植物基因组重组过程中的染色体复制事件是形成基因重复的重要原因之一,全基因组重复事件是生物界中的一个普遍现象^[21]。研究表明,大豆基因组经历过两轮大的多倍化事件,由此产生了全基因组水平的基因重复^[22]。本研究首先对大豆异黄酮还原酶家族成员进行了进化分析,发现该家族成员在进化过程中既经历了全基因组重复同时也经历了串联重复事件。第1、4、11号染色体上紧密连锁的基因同时存在着巨大的序列和结构差异,表明其在经历了串联重复之后,又发生了较多的序列丢失与扩增事件,从而导致结构乃至功能上的差异^[23]。另外,各家族成员在基因组位置、内含子-外显子数目以及保守结构域方面也存在较大差异,可以认为该家族成员的差异并非主要来自基因的串联重复,而是通过基因组复制的方式产生,这与银杏、红豆杉和烟草中的结论相一致^[24-26]。

异黄酮代谢是由不同基因所编码的酶控制,并以代谢流的方式流向不同的支路,从而形成了种类多样、结构复杂的各种组分及其衍生物。异黄酮还原酶作为大豆异黄酮分解的第一步和关键一步,其生物学功能还不甚明晰,整个大豆异黄酮的分解机制仍有待于进一步研究。因此,对大豆异黄酮还原酶基因家族的研究有助于进一步认识异黄酮代谢

途径中不同基因的表达机制以及相应代谢产物的生理作用,从而获得更多与异黄酮生物代谢相关的功能基因,为高黄酮大豆转基因育种提供试验基础。

参考文献

- [1] Xu B, Chang S K C. Characterization of phenolic substances and antioxidant properties of food soybeans grown in North Dakota-Minnesota Region[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(19): 9102-9113.
- [2] Ward H A, Kuhnle G G, Mulligan A A, et al. Breast, colorectal, and prostate cancer risk in the European Prospective Investigation into cancer and nutrition-norfolk in relation to phytoestrogen intake derived from an improved database[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2010, 91(2): 440-448.
- [3] Li S H, Liu X X, Bai Y Y, et al. Effect of oral isoflavone supplementation on vascular endothelial function in postmenopausal women: A meta analysis of randomized placebocontrolled trials [J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2010, 91(2): 480-486.
- [4] Cheng H, Yu O, Yu D Y. Polymorphisms of *IFS1* and *IFS2* gene are associated with isoflavone concentrations in soybean seeds[J]. Plant Science, 2008, 175(4): 505-512.
- [5] Lozovaya V V, Lygin A V, Zernova O V, et al. Modification of phenolic metabolism in soybean hairy roots through down regulation of chalcone synthase or isoflavone synthase [J]. Planta, 2007, 225(3): 665-679.
- [6] Subramanian S, Hu X, Lu G H, et al. The promoters of two isoflavone synthase genes respond differentially to nodulation and defense signals in transgenic soybean roots[J]. Plant Molecular Biology, 2004, 54(5): 623-639.
- [7] Chiari L, Piovesan N D, Naoe L K, et al. Genetic parameters relating isoflavone and protein content in soybean seeds[J]. Euphytica, 2004, 138(1): 55-60.
- [8] Dixon R A, Steele C L. Flavonoids and isoflavonoids-a gold mine for metabolic engineering[J]. Trends in Plant Science, 1999, 4(10): 394-400.
- [9] 乞永燕, Sofia M, Sjef B, 等. 大豆中 Glycinol 的分离与鉴定[J]. 色谱, 2005, 23(4): 353-357. (Qi Y Y, Sofia M, Sjef B, et al. Isolation and identification of Glycinol from *Glycine max* [L.] Merri[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2005, 23(4): 353-357.)
- [10] 李炜, 来永才, 毕远林, 等. 黑龙江省野生大豆高异黄酮新种质创新利用研究 II 异黄酮含量与大豆品质相关性的分析[J]. 大豆科学, 2007, 26(3): 319-321. (Li W, Lai Y C, Bi Y L, et al. Innovation and utilization of new high isoflavone resource of wild soybean in Heilongjiang II Analysis of relationship between isoflavone content and quality of soybean[J]. Soybean Science, 2007, 26(3): 319-321.)
- [11] Cheng H, Li L L, Xu F, et al. Expression patterns of an isoflavone reductase-like gene and its possible roles in secondary metabolism in *Ginkgo biloba* [J]. Plant Cell Reports, 2013, 32(5): 637-650.
- [12] 谢晓娜, 张小秋, 邵敏, 等. 甘蔗类异黄酮还原酶(IRL)基因的克隆与表达分析[J]. 生物技术通报, 2014, 11: 130-137. (Xie X N, Zhang X Q, Shao M, et al. Cloning and expression analysis of sugarcane isoflavone reductase-like (IRL) gene[J]. Biotechnology Bulletin, 2014, 11: 130-137.)
- [13] Babaoglu M, Davey M R, Power J B, et al. Transformed roots of *Lupinus mutabilis*: Induction, culture and isoflavone biosynthesis [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2004, 78(1): 29-36.
- [14] Schmutz J, Cannon S B, Schlueter J, et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean [J]. Nature, 2010, 463(7278): 178-183.
- [15] 王荣青, 万红建, 李志邈, 等. 番茄 *Hsp70* 基因鉴定及系统发育关系分析[J]. 核农学报, 2014, 28(3): 378-385. (Wang R Q, Wan H J, Li Z M, et al. Identification and phylogenetic relationships of *Hsp70* genes in tomato[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2014, 28(3): 378-385.)
- [16] 张古文, 刘莉莉, 王显瑞, 等. 谷子 *HSP70* 基因家族的全基因组鉴定及生物信息学分析[J]. 浙江农业学报, 2015, 27(7): 1127-1133. (Zhang G W, Liu L L, Wang X R, et al. Genome-wide identification and bioinformatics analysis of *HSP70* genes in foxtail millet [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2015, 27(7): 1127-1133.)
- [17] Tsukamoto C, Shimada S, Igita K, et al. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds; Changes in isoflavones, saponins and composition of fatty acids at different temperature during seed development [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 1995, 43(5): 1184-1192.
- [18] 罗燕, 郭万柱, 刘艳丽, 等. 猪细小病毒 SC-1 株 *VP2* 基因的克隆及生物信息学分析[J]. 动物医学进展, 2005, 26(8): 87-91. (Luo Y, Guo W Z, Liu Y L, et al. The cloning and bioinformatics analysis of *VP2* gene of porcine parvovirus strain SC-1[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2005, 26(8): 87-91.)
- [19] 赵海霞, 李成磊, 白悦辰, 等. 苦苣菜类异黄酮还原酶基因(*FtIRL*)的克隆及序列分析[J]. 食品科学, 2012, 33(11): 210-214. (Zhao H X, Li C L, Bai Y C, et al. Cloning and sequence analysis of the isoflavone reductase-like (*FtIRL*) gene from *Fagopyrum tatarium*[J]. Food Science, 2012, 33(11): 210-214.)
- [20] 陈伟, 林叶春, 高维常, 等. 烟草类异黄酮还原酶基因家族的分子克隆[J]. 中国农业大学学报, 2014, 19(6): 23-34. (Chen W, Lin Y C, Gao W C, et al. Molecular cloning of isoflavone reductase-like gene family from tobacco[J]. Journal of China Agricultural University, 2014, 19(6): 23-34.)
- [21] 李乐, 许红亮, 杨兴露, 等. 大豆 *LEA* 基因家族全基因组鉴定、分类和表达[J]. 中国农业科学, 2011, 44(19): 3945-3954. (Li L, Xu H L, Yang X L, et al. Genome-wide identification, classification and expression analysis of *LEA* gene family in soybean[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 44(19): 3945-3954.)
- [22] Li Y H, Zhou G, Ma J, et al. De novo assembly of soybean wild relatives for pan-genome analysis of diversity and agronomic traits [J]. Nature Biotechnology, 2014, 32(10): 1045-1052.
- [23] Zhu Q L, Guo T Y, Sui S Z, et al. Molecular cloning and characterization of a novel isoflavone reductase-like gene (*FcIRL*) from high flavonoids-producing callus of *Fagopyrum cymosum*[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2009, 44(7): 809-819.
- [24] Cheng H, Li L, Xu F, et al. Expression patterns of an isoflavone reductase-like gene and its possible roles in secondary metabolism in *Ginkgo biloba* [J]. Plant Cell Reports, 2013, 32(5): 637-650.
- [25] Nasiri J, Naghavi M R, Alizadeh H, et al. Seasonal-based temporal changes fluctuate expression patterns of *TXS*, *DBAT*, *BAPT* and *DBTNBT* genes alongside production of associated taxanes in *Taxus baccata* [J]. Plant Cell Reports, 2016, 35(5): 1103-1119.
- [26] Shoji T, Wanz R, Iwase T, et al. Expression patterns of two tobacco isoflavone reductase-like genes and their possible roles in secondary metabolism in tobacco[J]. Plant Molecular Biology, 2002, 50(3): 427-440.