

鸳鸯茉莉查尔酮异构酶基因(*CHI*)cDNA的克隆与生物信息学分析

曹玉婷, 邱栋梁*

(福建农林大学园艺学院, 福州 350002)

摘要: 采用 RT-PCR 与 RACE 技术克隆了鸳鸯茉莉(*Brunfelsia acuminata*)花瓣中查尔酮异构酶基因(*CHI*)的全长 cDNA, GenBank 登录号为 JN887637。该基因全长 1051 bp, 含有 1 个 792 bp 的开放阅读框, 编码 263 个氨基酸, 为不稳定蛋白。对保守区功能区的分析, 推导 CHI 蛋白具有查尔酮超级家族的保守结构域, 二级结构预测显示其主要以 α 螺旋和 β 折叠为主。氨基酸同源性分析表明, 鸳鸯茉莉 CHI 蛋白与矮牵牛(*Petunia hybrida*)、金花茶(*Camellia nitidissima*)、甜樱桃(*Prunus avium*)、芍药(*Paeonia lactiflora*)、牡丹(*P. suffruticosa*)、菊花(*Chrysanthemum morifolium*)等植物的同源性分别达到 90%、89%、84%、85%、84%、80%。因此, *CHI* 基因可能与鸳鸯茉莉的花色形成有关。

关键词: 鸳鸯茉莉; 查尔酮异构酶; 基因克隆; 生物信息学

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2012.05.008

Cloning and Sequence Analysis of Chalcone Isomerase Gene (*CHI*) from *Brunfelsia acuminata* Flowers

CAO Yu-ting, QIU Dong-liang*

(College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: The chalcone isomerase gene (*CHI*) cDNA from *Brunfelsia acuminata* flowers was cloned by RT-PCR and RACE, with GenBank accession number JN887637. The full length cDNA of *CHI* was 1051 bp with an open reading frame (ORF) of 792 bp, encoding an unstable protein with 263 amino acids. *CHI* protein from *B. acuminata* flower has conserved domain belonging to chalcone superfamily. It was predicted that the secondary structure of *CHI* protein dominated by α -coil and β -sheet. The amino acid sequence of *CHI* from *B. acuminata* flowers had homologous to those from *Petunia hybrida*, *Camellia nitidissima*, *Prunus avium*, *Paeonia lactiflora*, *P. suffruticosa*, *Chrysanthemum morifolium* for 90%, 89%, 84%, 85%, 84% and 80%, respectively. It suggested that *CHI* gene related to flower color formation of *B. acuminata*.

Key words: *Brunfelsia acuminata*; Chalcone isomerase; Gene clone; Bioinformatics

鸳鸯茉莉(*Brunfelsia acuminata*)是茄科(Solanaceae)鸳鸯茉莉属常绿矮灌木,花多单生,有时数朵组成聚伞花序^[1]。鸳鸯茉莉具有极高的观赏价值,初开时为紫色,后变为淡紫色,最后变为白色。由于开花时间有先后,在同一植株上能同时看到不同

颜色的花,故又得名“双色茉莉”。

鸳鸯茉莉花瓣中的色素主要为花色苷。花色苷作为黄酮的一种^[2],合成受到多个关键酶的限制。查尔酮异构酶(chalcone isomerase, *CHI*)是黄酮类代谢途径中第二步反应的催化酶,是增加黄酮

收稿日期: 2011-11-20 接受日期: 2012-02-13

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2011J01082)资助

作者简介: 曹玉婷(1987~),女,硕士生,研究方向为植物生理与分子生物学。E-mail: caoyt87@163.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: qiudl1970@yahoo.com.cn

醇产物的关键酶之一^[3],它催化查尔酮形成二氢黄酮,查尔酮由第一步查尔酮合成酶(CHS)催化一个香豆酰辅酶 A 和三个丙二酰辅酶 A 而形成。

目前,查尔酮异构酶基因在许多植物中已经被克隆,而鸳鸯茉莉的相关研究鲜见报道。本文通过 RT-PCR 和 RACE 技术,克隆得到鸳鸯茉莉查尔酮异构酶基因(*CHI*)的全长 cDNA,对其序列和编码的蛋白质进行生物信息学分析,以期为鸳鸯茉莉花色形成的分子机制研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料鸳鸯茉莉(*Brunfelsia acuminata*)取自福建农林大学校内绿化带。采集待开放的花瓣,洗净后用液氮速冻,−80℃冰箱中保存备用。

多糖多酚植物总 RNA 快速提取试剂盒购于百泰克生物技术(北京)有限公司;Ex Taq™ 酶, dNTP, DEPC-H₂O, DNA Marker DL2000、X-gal、IPTG、cDNA 合成试剂盒 Super SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit 购于 Clontech 公司;cDNA 第一链合成试剂盒购于 Fermentas 公司;胶回收试剂盒购于大连宝生物有限公司(Takara);胰蛋白胨、酵母提取物购于 OXOID 公司;琼脂糖购于 MDBio 公司;大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态 DH5α 购于天根生化科技(北京)有限公司;其他常规试剂均为国产分析纯和超纯试剂。

1.2 总RNA提取

称取 100 mg 花瓣,按照百泰克多糖多酚植物总 RNA 快速提取试剂盒实验操作步骤进行 RNA 制备,制备好的总 RNA 最终溶解于 30 μL DEPC-H₂O 中。

1.3 *CHI*基因的克隆

参照 Fermentas 公司的 Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis 试剂盒,合成 cDNA 第一链。根据 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中报道的植物 *CHI* 基因同源性较高的核苷酸序列,设计保守区简并引物 *CHI*-conF: 5'-GTSAGAGGB-HTGGARATYSAAGG-3' 和 *CHI*-conR: 5'-GGDGA-MACDCCWTKYTYCCCDAT-3', 反应程序为: 94℃ 5 min; 94℃ 40 s; 51℃ 40 s; 72℃ 60 s; 35 个循环; 4℃ 保存。经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,将目

的片段回收与 pMD18-T 载体连接,经热激法转化到大肠杆菌 DH5α 中,用蓝白斑筛选重组子,挑选阳性克隆的单菌落 37℃ 培养 12 h,经菌液验证后选择(2 个以上)扩增出与目的片段一致的条带送上海博尚生物技术有限公司进行测序。

参照 SMART™ RACE cDNA Amplification 试剂盒说明书合成 3'RACE 和 5'RACE 的模板 cDNA。并根据测序结果设计 3'RACE 特异引物 GSP-218: 5'-GGAGAAGGTGGCGGAGAATT-3' 和 GSP-395: 5'-AGACGATTCGGTAGCTGGCT-3' 与 UPM: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3', 按照 Advantage® 2 PCR Kit 说明书进行第一轮和第二轮扩增,对扩增产物进行测序,获得 *CHI* 基因 cDNA 的 3' 末端序列; 同样设计 5'RACE 特异引物 GSP-175: 5'-GTAAATTTCTCAAACGGACC-3' 和 GSP-46: 5'-TCGCCGTGAACTTAACAAAC-3' 与 UPM 进行第一轮和第二轮扩增,获得 5' 末端序列。

根据所得的拼接序列在起始密码子和终止密码子附近设计特异引物 FPF: 5'-ATGTCTCCAT-TAGTGTCCGTTACTC-3' 和 FPR: 5'-GTGTCCTA-ACTAGCCTTTAATTTCTGG-3', 进行 PCR 扩增,得到鸳鸯茉莉 *CHI* 基因的开放阅读框(ORF)。

1.4 生物信息学分析

测序结果在 GenBank 中进行 Blast 分析。利用在线软件 ProtParam (<http://www.expasy.org>)预测所编码蛋白的分子量和等电点等。蛋白质二级结构利用软件 AntheProt 6.0 进行分析,利用 SWISS-MODEL 进行蛋白质三级结构建模。采用 DNAMAN 6.0、ClustalX 1.8 和 MEGA 5.0 软件进行多序列比对及系统进化分析。

2 结果和分析

2.1 *CHI*基因cDNA的克隆

利用一对简并引物 *CHI*-conF 和 *CHI*-conR 进行保守区扩增,以逆转录合成的 cDNA 为模板,产物经琼脂糖凝胶电泳,可见 1 条约 500 bp 的条带(图 1),经回收测序,得到一段 494 bp 的 cDNA 序列,经过 DNAMAN 6.0 软件和 Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)程序分析,该序列为 *CHI* 基因 cDNA 的同源片段。

利用 3'RACE 特异引物 GSP-218 和 GSP-395

与接头引物 UPM, 以 3'-cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 经过第二轮 PCR 得到一条约 500 bp 的条带, 经回收测序, 得到一段长度为 521 bp 的 cDNA 序列, 该片段包含 1 个 16 bp 的多聚腺苷酸 (polyA) 尾, 并有 99 bp 与保守区序列重叠。

利用 5'RACE 特异引物 GSP-175 和 GSP-46 与接头引物 UPM, 以 5'-cDNA 为模板, 进行 PCR 扩

增, 经过第二轮 PCR 得到一条约 300 bp 的条带, 经回收测序, 得到一段长度为 306 bp 的 cDNA 序列, 该片段有 176 bp 与保守区序列重叠。

2.2 *CHI*基因核苷酸序列分析

将得到的 3 个片段进行拼接整合, 获得 1051 bp 的 *CHI* 基因全长序列(图 2), GenBank 登

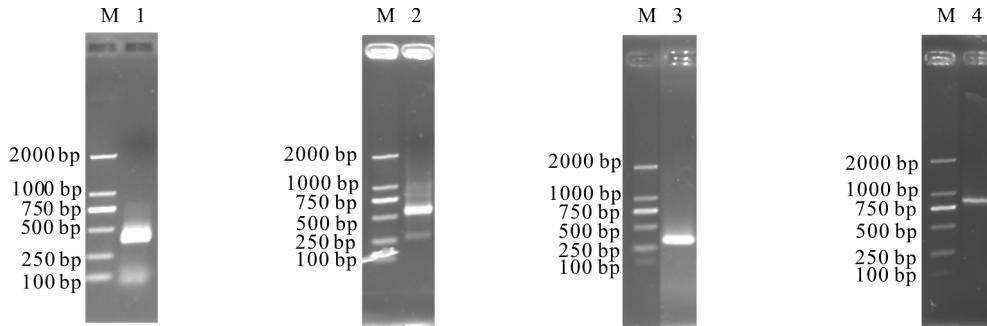


图1 鸳鸯茉莉*CHI*基因的PCR扩增。M: DNA Marker; 1: 保守区; 2: 3'RACE; 3: 5'RACE; 4: 全长cDNA。

Fig. 1 PCR of *CHI* from *Brunfelsia acuminata*. M: DNA Marker; 1: Conservative region; 2: 3'RACE; 3: 5'RACE; 4: Full length cDNA.

```

1      ACATGGGAAAGTAGATCAACA[ATG]TCTCCATTAGTGTCCGTTACTCAAGTGCAGGTAGA
1      M S P L V S V T Q V Q V E
61     GAATTACGTGTTTCCACCGACGGTGAACCTACTGGTTCTACCAATACCTTGTTCCTAGC
14     N Y V F P P T V N P T G S T N T L F L A
121    TGGTCTGGGCATAGGGGTTTAGAAATTGAAGGGAAGTTTGTTAAGTTCACGGCGATAGG
34     G A G H R G L E I E G K F V K F T A I G
181    TGTGTACCTGGAAGAGAGTGCATTCTTTTTGGCCGATAAATGGAAGGGGAAGACCGT
54     V Y L E E S A I P F L A D K W K G K T V
241    TGAGGAGCTGAAACAATCGGTGGAGTCTTTAGGGATGTAGTTACTGGTCCGTTTGAGAA
74     E E L K Q S V E F F R D V V T G P F E K
301    ATTTACTCGAGTTACTATGATCTTGCCCTTGACGGGTAAGCAGTACTCGGAGAAGGTGGC
94     F T R V T M I L P L T G K Q Y S E K V A
361    GGAGAATTGCGTTGCATATTGGAAGCAATAGGAAGTATACTGATCGGAGAGTAAAGC
114    E N C V A Y W K A I G T Y T D A E S K A
421    CATTGAGAAGTTCATTGATGTTTTCAAGAGTGAACGTTCCCCCTGCTGCCTCGATCCT
134    I E K F I D V F K S E T F P P A A S I L
481    TTTTACTCAATCACCTGTTGGTTCGCTGACGATTAGCTTTAGTAAAGACGATTTCGGTAGC
154    F T Q S P V G S L T I S F S K D D S V A
541    TGGCTCTGGGAATGTTGTTATTGAGAACAACAATTGTCAGAAGCAGTGCTGGAATCCAT
174    G S G N V V I E N K Q L S E A V L E S I
601    AATAGGGAAGCATGGAGTGTCCCCTGCAGCAAAGTGTAGTCTCGCCGAGAGAGTTTCAGA
194    I G K H G V S P A A K C S L A E R V S E
661    ACTACTCAACAAGAGCTATGATGAGGCATCTGTTTGTGAGAAAACCGAACCAGAAAAATC
214    L L N K S Y D E A S V C E K P G T E K S
721    ACCCGATCCAGTGACTGGACTTCAGTTAGGACAAGAAAAAATACCACTTCAGAAATCGA
234    P D P V T G L Q L G Q E K N T T S E I E
781    AGAGGAAGTTACCATTCCAGAAATTAAGGC[TAG]TAGGACACAAAAATGGTTGCTGAAA
254    E E V T I P E I K G *
841    CTCCCTTGTAATGGCCCAATGTTGTCATTTGTTGCCGTAGTAGAGGAATGATTGAGCCG
901    AGTATTTTGTACTTTTCTACTATGCAGTAGTATGCAACAAGGCCCATATCTGTATTTG
961    CGTCAGCTGTGTAAGCCTTGAGTTTTAACTCGATATTTATAA[AATAA]AAGAATATATAA
1021   GAATTGGAACAGTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

图2 *CHI*基因的cDNA序列及推导的氨基酸序列。[ATG]: 起始密码子; [TAG]: 终止密码子; [AATAA]: 加尾信号。

Fig. 2 Full length of nucleotide and deduced amino acid sequence of *CHI*. [ATG]: Start codon; [TAG]: Stop codon; [AATAA]: Polyadenylation signal.

录号为 JN887637。该 cDNA 序列包含 1 个 792 bp 的完整开放阅读框,与以 *CHI* 基因 cDNA 第一链为模板,利用引物 FPF 和 FPR 扩增该基因的 ORF 的长度相同,并且经 DNAMAN 6.0 比对后序列相同。

通过与 GenBank 中其他植物的 *CHI* 基因进行 Blast 比较,结果表明,鸳鸯茉莉与矮牵牛(*Petunia hybrida*: Y00852.1)、金花茶(*Camellia nitidissima*: HQ269805.1)、甜樱桃(*Prunus avium*: GU990525.1)、杜鹃花(*Rhododendron pulchrum*: AB289600.1)、牡丹(*Paeonia suffruticosa*: JN105297.1)、芍药(*Paeonia lactiflora*: JN119872.1)、菊花(*Chrysanthemum morifolium*: JF834891.1)的同源性分别达到 83%、76%、73%、75%、73%、72%、71%。

2.3 CHI 蛋白质结构分析

通过 ProtParam 软件对鸳鸯茉莉 CHI 蛋白进行在线分析,结果表明,792 bp 的 *CHI* 基因 ORF 核苷酸共编码 263 个氨基酸,推测 CHI 蛋白的分子量和等电点分别为 28.54 kD 和 4.91,为不稳定蛋白。

利用 AntheProt 6.0 软件和 Garnier 算法对 CHI 蛋白的二级结构进行预测,结果表明,CHI 蛋白中 α -螺旋为 55%、 β -折叠为 28%、 β -转角为 5%、其他松散结构为 13%。在 CHI 蛋白中, α -螺旋和 β -折叠为最主要的结构元件,而 β -转角和松散结构则散布于蛋白中。

将 *CHI* 基因编码的氨基酸序列提交 SWISS-MODEL^[4-6]在线分析软件,预测蛋白质的三级结构,预测结果表明,CHI 蛋白含有大量的 α -螺旋和 β -折叠,与二级结构的预测结果相符(图 3)。由

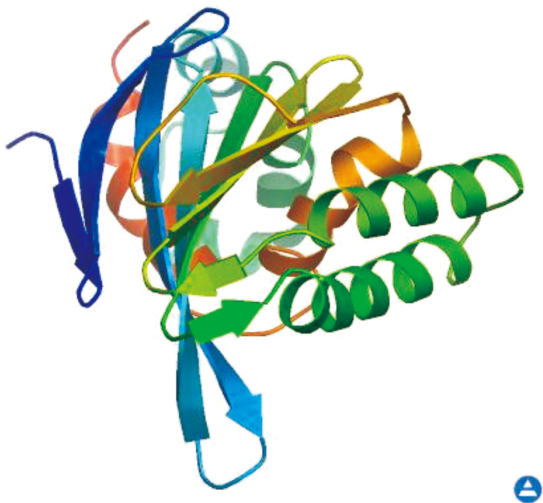


图 3 CHI 蛋白的三级结构预测

Fig. 3 Tertiary structure prediction of CHI

图 3 可以看出,鸳鸯茉莉 CHI 蛋白的三级结构是由一个大的 β -折叠和由 3 个短的 β -折叠形成的 α -螺旋在大 β -折叠的背面形成一个核心区,CHI 蛋白质呈现三明治状,CHI 蛋白的空间结构与 Jez^[7]和 Micheal^[8]的研究结果相符。

利用 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>)分析程序的 Kyte and Doolittle 算法对鸳鸯茉莉查尔酮异构酶蛋白进行亲水/疏水性分析。结果表明,在 245~251 区域的亲水性最强,在 48~53 区域的疏水性最强。由图 4 可见,查尔酮异构酶的亲水区域大于疏水区域,所以该蛋白属于亲水蛋白。

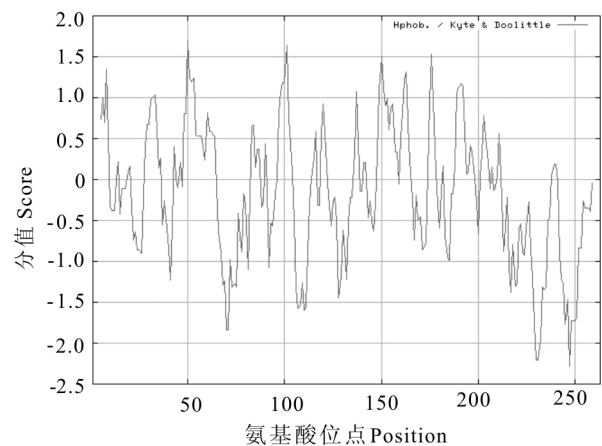


图 4 CHI 的亲水性/疏水性分析

Fig. 4 Hydrophilicity/Hydrophobicity analysis of CHI protein from *Brunfelsia acuminata*

2.4 CHI 蛋白质同源性分析

将 *CHI* 基因编码的氨基酸序列进行 Blast 分析,结果表明,*CHI* 推导的氨基酸序列与矮牵牛、金花茶、甜樱桃、芍药、牡丹、菊花的同源性分别达到 90%、89%、84%、85%、84%、80% (图 5)。利用 ClustalX 1.8 和 MAGA 5.0,对目前已经克隆的 *CHI* 基因推测的氨基酸序列进行比对,构建 Neighbor-Joining 系统进化树,并进行 Bootstrap 分析。结果(图 6)表明,鸳鸯茉莉 CHI 蛋白与矮牵牛与烟草归到同一分支上,与矮牵牛与烟草非常接近。这与实验预期相符合,也在一定程度上说明了克隆得到的基因为 *CHI* 基因。

2.5 CHI 基因保守区预测与分析

将鸳鸯茉莉 *CHI* 基因编码的氨基酸序列提交 NCBI 的 Protein conserve domain (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)进行保守区分

析,结果表明,鸳鸯茉莉 *CHI* 蛋白质保守区域是属于查尔酮超级家族区域。

3 讨论

查尔酮异构酶是类黄酮和异黄酮生物合成中的关键酶,主要催化查尔酮(4,2',4',6'-四羟基查尔酮)或 6'-脱氧查尔酮(4,2',4'-三羟基查尔酮),发生分子内环化形成(2S)-黄烷酮(5,7,4'-三羟基查尔酮)或(2S)-5-脱氧黄烷酮(7,4-二羟基查尔酮)^[9]。

目前 *CHI* 基因已经在矮牵牛、大丽花、翠菊、菊花、芍药、牡丹等多种花卉中得到克隆。*CHI* 基因 cDNA 序列的同源性很低,一般只有 42%~65%,即使在同一物种间的差异也比较大^[10],所以给同源

克隆造成了一定的难度。本实验运用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆得到 *CHI* 基因的全长,说明只要设计出合理的引物,同源性很低的物种也能克隆得到全长。

从矮牵牛中克隆得到的两个查尔酮异构酶基因 *CHI-A* 和 *CHI-B*,经研究表明,在植物的不同组织中,这两个基因的表达具有特异性^[11]。本文克隆得到的 *CHI* 基因与矮牵牛 *CHI-A* 基因的同源性最高,*CHI-A* 基因在雄蕊和花冠中表达,*CHI-B* 基因在未成熟的花药中表达^[12]。

查尔酮异构酶基因在植物中表达量的多少,影响黄酮类化合物在植物中的积累。目前,通过直接改变 *CHI* 基因来改变花色的研究较少。但是,有

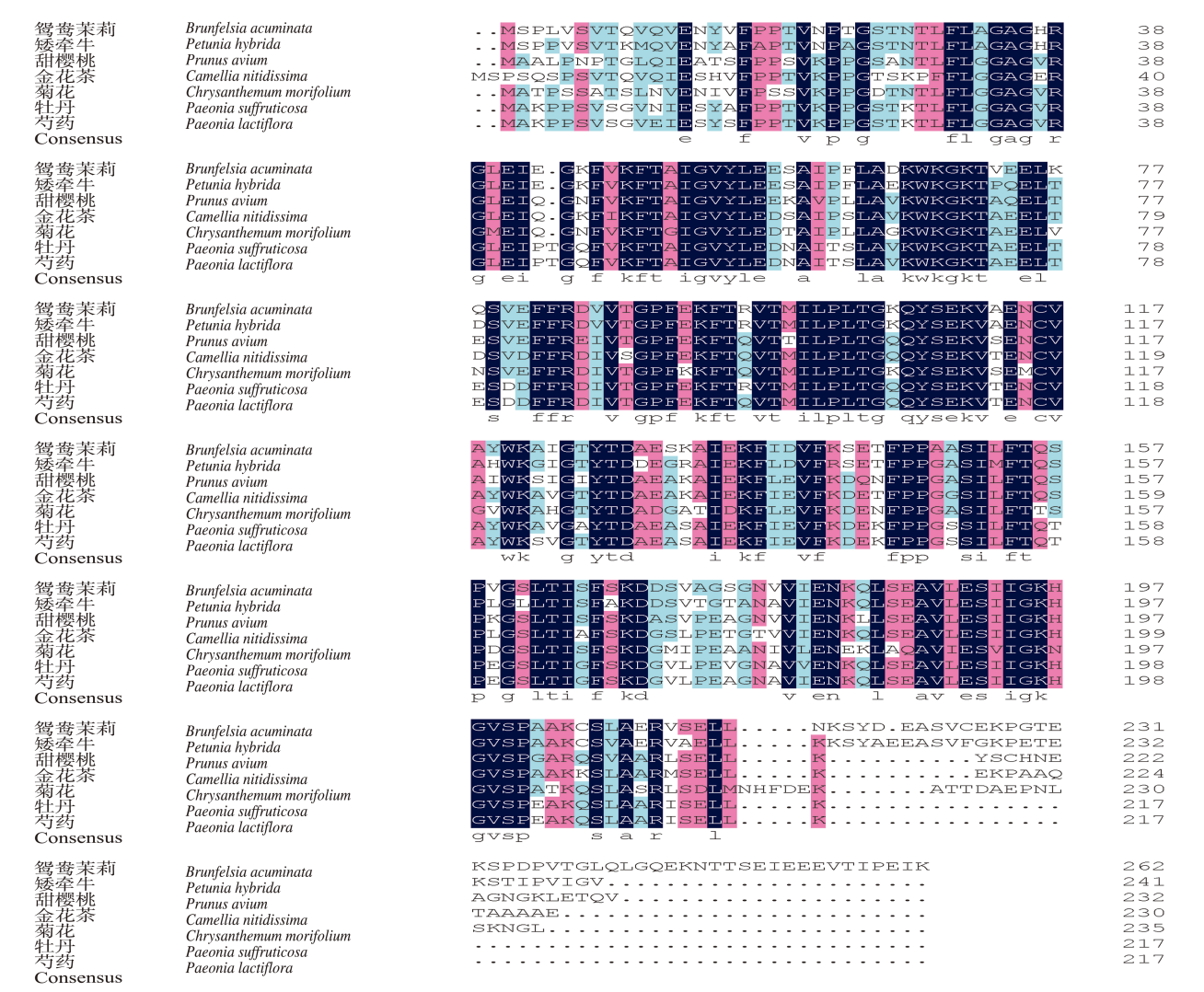


图5 不同植物CHI的氨基酸序列分析。矮牵牛: P11650.1; 金花茶: ADZ28513.1; 甜樱桃: ADZ54781.1; 芍药: AEK32592.1; 牡丹: AEK70330.1; 菊花: AEP37358.1。

Fig. 5 Multiple alignment of predicted amino acid sequences of CHI from different plants. *Petunia hybrida*: P11650.1; *Camellia nitidissima*: ADZ28513.1; *Prunus avium*: ADZ54781.1; *Paeonia lactiflora*: AEK32592.1; *P. suffruticosa*: AEK70330.1; *Chrysanthemum morifolium*: AEP37358.1.

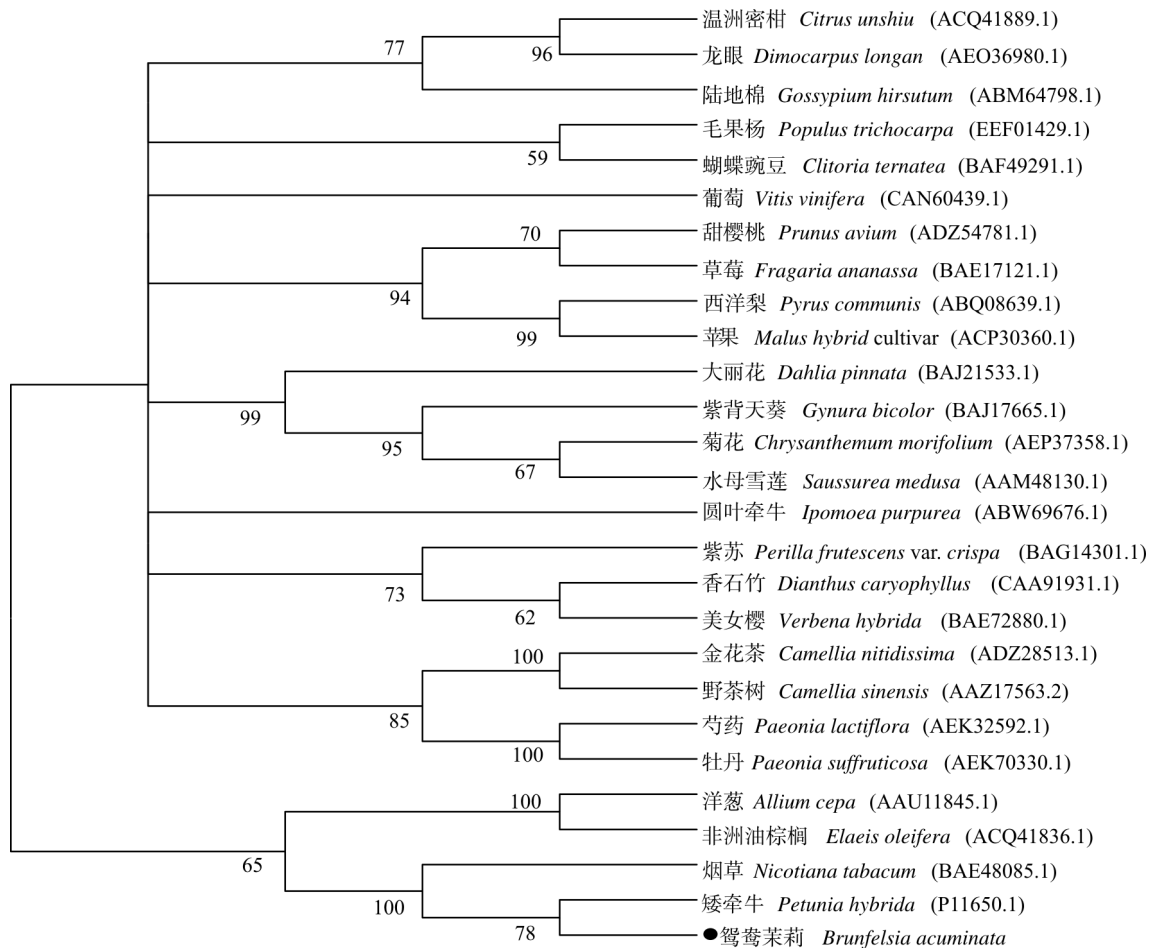


图 6 CHI 蛋白的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of CHIs

研究表明,洋葱(*Allium cepa*)查尔酮异构酶的失活,其花的颜色变为金色^[13];将 *CHI* 基因与 *CHS* 基因、*DFR* 基因同时转化至马铃薯(*Solanum tuberosum*)中,使这些基因过量表达,提高了花色苷等黄酮类化合物的含量^[14];通过实时荧光定量 PCR (RQ-PCR)对银杏(*Ginkgo biloba*)叶片进行分析,查尔酮异构酶活性与 *CHI* 基因的转录水平和叶片中的黄酮类物质的积累相关^[15];甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)的根毛用酵母提取物和 PEG8000 处理,以提高 *CHI* 基因的表达,结果甘草根毛中的类黄酮有明显增加^[16];使黄芩(*Scutellaria baicalensis*)根毛部的 *CHI* 基因沉默后,黄酮类物质的积累也随之减少^[17]。这些研究在一定程度上说明了 *CHI* 基因的表达量会影响到花的颜色变化。

本实验首次克隆了鸳鸯茉莉查尔酮异构酶基因(*CHI*)的全长 cDNA,其长度为 1051 bp,包含 1 个 792 bp 的开放阅读框,共编码 263 个氨基酸,并对其进行生物信息学分析,预测查尔酮异构酶的分

子量大小和等电点分别为 28.54 kD 和 4.91,为不稳定的亲水蛋白;二级结构中以 α -螺旋和 β -折叠为主,其保守结构域是属于查尔酮超级家族区域。应用生物信息学方法对鸳鸯茉莉查尔酮异构酶基因编码的蛋白质进行比对、分析,从而对其结构和功能进行推断和预测,为该基因的功能研究提供科学依据。

参考文献

- [1] Chen J Y, Cheng Z K. China Flower [M]. Shanghai: Shanghai Culture Press, 1990: 1-504.
陈俊愉,程诸珂. 中国花经 [M]. 上海: 上海文化出版社, 1990: 1-504.
- [2] Madhuri G, Arjula R R. Plant biotechnology of flavonoids [J]. Plant Biotechnol, 1999, 16(3): 177-199.
- [3] Muir S R, Collins G J, Robinson S, et al. Overexpression of *Petunia* chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols [J]. Nat Biotechnol, 2001, 19(5): 470-474.

- [4] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, et al. The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling [J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(2): 195–201.
- [5] Schwede T, Koop J, Guex N, et al. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server [J]. *Nucl Acids Res*, 2003, 31(13): 3381–3385.
- [6] Guex N, Peitsch M C. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling [J]. *Electrophoresis*, 1997, 18(15): 2714–2723.
- [7] Jez J M, Bowman M E, Dixon R A, et al. Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase [J]. *Nat Struct Biol*, 2000, 7(9): 786–791.
- [8] Gensheimer M, Mushegian A. Chalcone isomerase family and fold: No longer unique to plants [J]. *Protein Sci*, 2009, 13(2): 540–544.
- [9] Shimada N, Aoki T, Sato S, et al. 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 Physiol*, 2003, 131(3): 941–951.
- [10] Druka A, Kudrna D, Rostoks N, et al. Chalcone isomerase gene from rice (*Oryza sativa*) and barley (*Hordeum vulgare*): Physical, genetic and mutation mapping [J]. *Genetic*, 2003, 302(1/2): 171–178.
- [11] van Tunen A J, Koes R E, Spelt C E, et al. Cloning of the two chalcone flavanone isomerase genes from *Petunia hybrida*: Coordinate, light-regulated and differential expression of flavonoid genes [J]. *EMBO J*, 1988, 7(5): 1257–1263.
- [12] Tunen A J, Hartman S A, Mur L A, et al. Regulation of chalcone flavanone isomerase (CHI) gene expression in *Petunia hybrida*: The use of alternative promoters in corolla, anthers and pollen [J]. *Plant Mol Biol*, 1989, 12(5): 539–551.
- [13] Kim S, Jones R, Yoo K S, et al. Gold color in onions (*Allium cepa*): A natural mutation of the chalcone isomerase gene resulting in a premature stop codon [J]. *Mol Genet Genom*, 2004, 272(4): 411–419.
- [14] Lukaszewicz M, Matysiak-Kata I, Skala J, et al. Antioxidant capacity manipulation in transgenic potato tuber by changes in phenolic compounds content [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(6): 1526–1533.
- [15] Cheng H, Li L L, Cheng S Y, et al. Molecular cloning and function assay of a chalcone isomerase gene (*GbCHI*) from *Ginkgo biloba* [J]. *Plant Cell Rep*, 2011, 30(1): 49–62.
- [16] Zhang H C, Liu J M, Lu H Y, et al. Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by combining the over-expression of chalcone isomerase gene with the elicitation treatment [J]. *Plant Cell Rep*, 2009, 28(8): 1205–1213.
- [17] Park N II, Xu H, Li X H, et al. Enhancement of flavone levels through overexpression of chalcone isomerase in hairy root cultures of *Scutellaria baicalensis* [J]. *Func Integr Genom*, 2011, 11(3): 491–496.