

查尔酮异构酶基因的分子特征及其在基因工程中的应用

吴冰¹, 祝钦泷^{1,2}, 郭余龙¹, 眭顺照¹, 皮伟¹, 李名扬^{1,*}

¹西南大学园艺园林学院, 花卉研究所, 重庆 400716; ²华南农业大学生命科学学院, 广东省植物功能基因组与生物技术重点实验室, 广州 510642

Molecular Characteristics of Chalcone Isomerase Gene and Its Application in Gene Engineering

WU Bing¹, ZHU Qin-Long^{1,2}, GUO Yu-Long¹, SUI Shun-Zhao¹, PI Wei¹, LI Ming-Yang^{1,*}

¹Institute of Ornament Plants, College of Horticulture and Landscape, Southwest University, Chongqing 400716, China; ²Key Laboratory of Plant Functional Genomics and Biotechnology of Education Department of Guangdong Province, College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

摘要: 介绍了查尔酮异构酶(CHI)的结构与作用机制、CHI基因的结构特征、系统进化、时空表达特性以及在基因工程中的应用研究进展。

关键词: 查尔酮异构酶; 分子特征; 基因工程

类黄酮是植物的次生代谢产物, 参与植物花色的形成、紫外光辐射防护、抵抗病原体、花粉发育、植物激素运输以及豆科植物根与根瘤菌之间的相互作用, 其生理功能是多方面的。查尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI, EC 5.5.1.6)是类黄酮合成途径中早期阶段的关键酶之一, 是植物花色苷生物合成和豆科异黄酮植物植保素合成所必需的酶, 它以单体的形式普遍存在于大多数植物中, 其蛋白的三维折叠结构在植物中具有惟一性, 已被看成是一种植物特有的基因标记(Gensheimer 和 Mushegian 2004)。因此, CHI基因调控机制的研究对于了解豆科植物异黄酮生物合成特性和花色形成的分子机制有重要的意义。

1 CHI基因的分选和结构

1987年从法国豌豆(*Franch bean*)中采用抗体技术分离出CHI基因(Mehdy 和 Land 1988)。1988年, 在矮牵牛(*Petunia hybrida*)中以相同的方法得到CHI(van Tunen 等 1988)。后来又用同源克隆的方式相继在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、菜豆(*Phaseolus vulgaris*)、苜蓿(*Medicago sativa*)、翠菊(*Callistephus chinensis*)、橙(*Citrus sinensis*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)和玉米(*Zea mays*)等多种植物中克隆得到。主要是在草本植物中克隆得到CHI基因, 更多的序列信息可在NCBI网站上获得。迄今在细菌中也分离到类CHI蛋白(Gensheimer 和 Mushegian 2004), 如在人类粪便的

厌氧真细菌(*Eubacterium ramulus*)中也纯化到CHI蛋白, 这种蛋白具有异构化柚皮素、紫柳因、异甘草素的活性, 能将这些物质异构化, 然后还原、脱水, 最后降解成间苯三酚和3-(4-羟基)-丙氨酸(Herles 等 2004)。

CHI一般分成2种类型(Shimada 等 2003): 类型I是只能催化6'-羟基查尔酮转变成5'-羟基黄酮, 除豆科光叶百脉根的LjCHI-2属于该类型外, 类型I存在于绝大多数非豆科植物中; 类型II是存在于豆科植物中, 能催化6'-脱氧查尔酮和6'-羟基查尔酮生成异黄酮类化合物和黄酮类化合物。迄今的研究表明, 除在植物中普遍存在外, 在真菌、粘土霉菌和很多 γ 蛋白细菌中都存在与植物CHI直向同源的类CHI蛋白基因, 根据Gensheimer 和 Mushegian (2004)的研究结果, 真菌和细菌中的类CHI蛋白家族可归为CHI的类型III, 如人类粪便中的厌氧细菌(*Eubacterium ramulus*)的CHI蛋白。

CHI基因编码的蛋白一般为210~240位氨基酸, 蛋白间的同源性约为50%~80%, 其中I型CHI内部的氨基酸比对的一致性(约80%)高于II型CHI内部的氨基酸(约50%), 这2种类型均具有约200个氨基酸组成的保守的查尔酮结构域和多个活性相关的保守氨基酸残基(图1)。CHI基因的典型

收稿 2007-11-05 修定 2008-01-02

* 通讯作者(E-mail: limy@swu.edu.cn; Tel: 023-68250086)。

结构一般由4个外显子和3个内含子组成(图2)。在单子叶植物中,玉米含有3个CHI基因,而在水稻和大麦中只有单一基因,除大麦的CHI基因是由3个外显子组成外,玉米和水稻都由4个大小相近的外显子组成(Druka等2003)。在双子叶的非豆科植物中,拟南芥和矮牵牛中都含有2个CHI基因,而油菜中可能含有6个CHI基因(许本波2006),除油菜的BnCHI-2含有5个外显子外,其余都符合典型结构。上述几种植物都属于含有I型CHI基因。在豆科植物光叶百脉根(Lotus japonicus)的5号染色体上串联排列着4个CHI基因,除LjCHI-2只含有3个外显子,且属于I型CHI基因外,其余的豆科植物及光叶百脉根所含有的其余3个CHI基因的结构都与典型结构一致,且都是属于II型CHI基因。LjCHI-2是目前发现的惟一属于豆科植物的I型CHI基因(Shimada等

2003)。由此可以看出,不同种属的CHI氨基酸序列或核酸序列存在一定的异同,同时其基因结构也存在差异,分析CHI同源基因的结构对研究种属和种间差异很重要,同时其内含子的这种多样性变化,也为研究内含子进化起源提供了十分有用的模型。

2 CHI蛋白的作用机制

CHI是类黄酮代谢途径中的第2个关键酶(图3),催化分子内的环化反应,其底物为CHS催化合成的查尔酮(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)。在CHI的作用下,底物的2'位羟基失氢与β位断裂的碳碳双键形成“-O-”键,从而分别形成分子内环化的(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),其环化反应都需要底物具有2'位羟基基团(Jez等2000)。CHI催化活性具

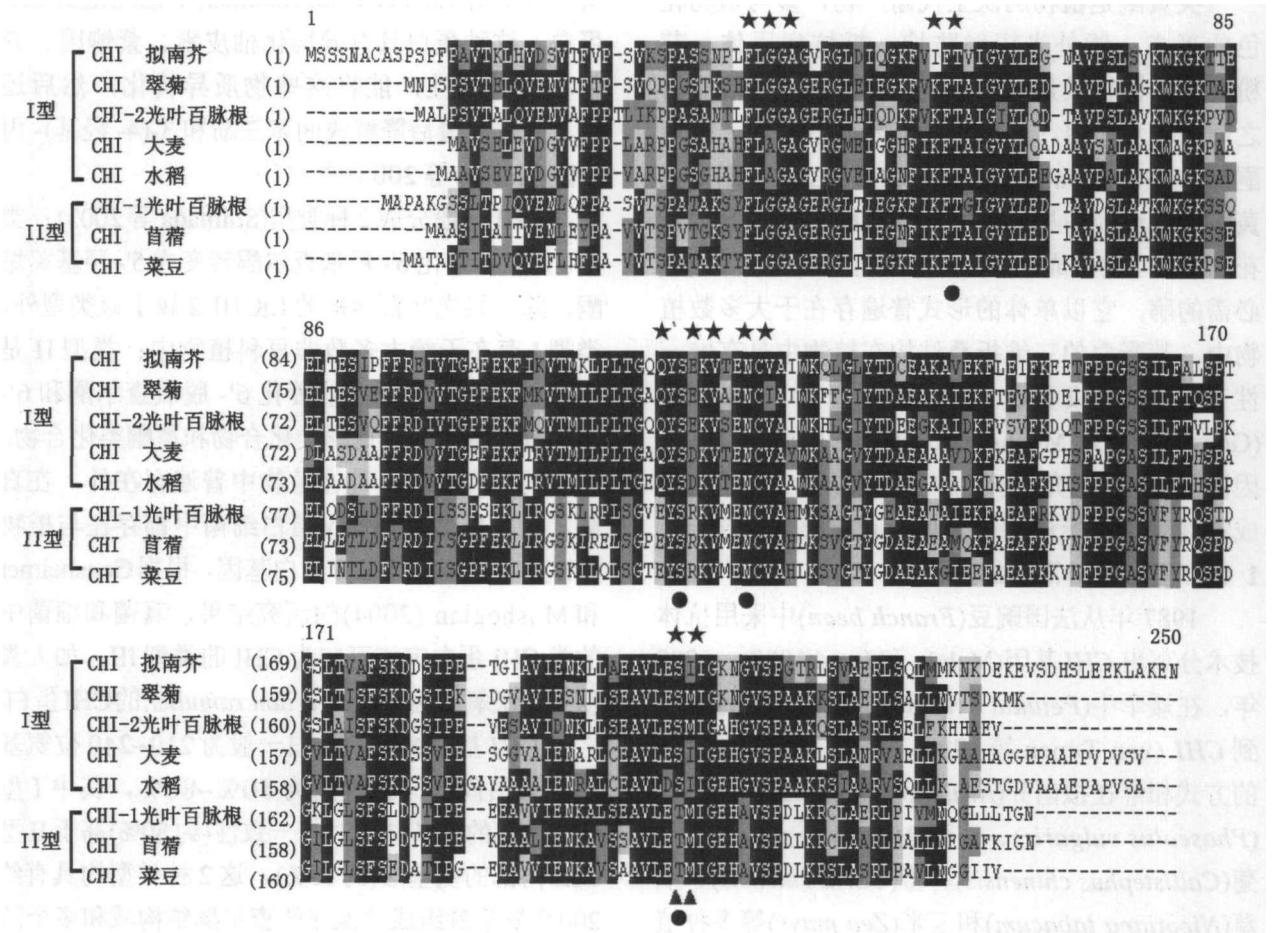
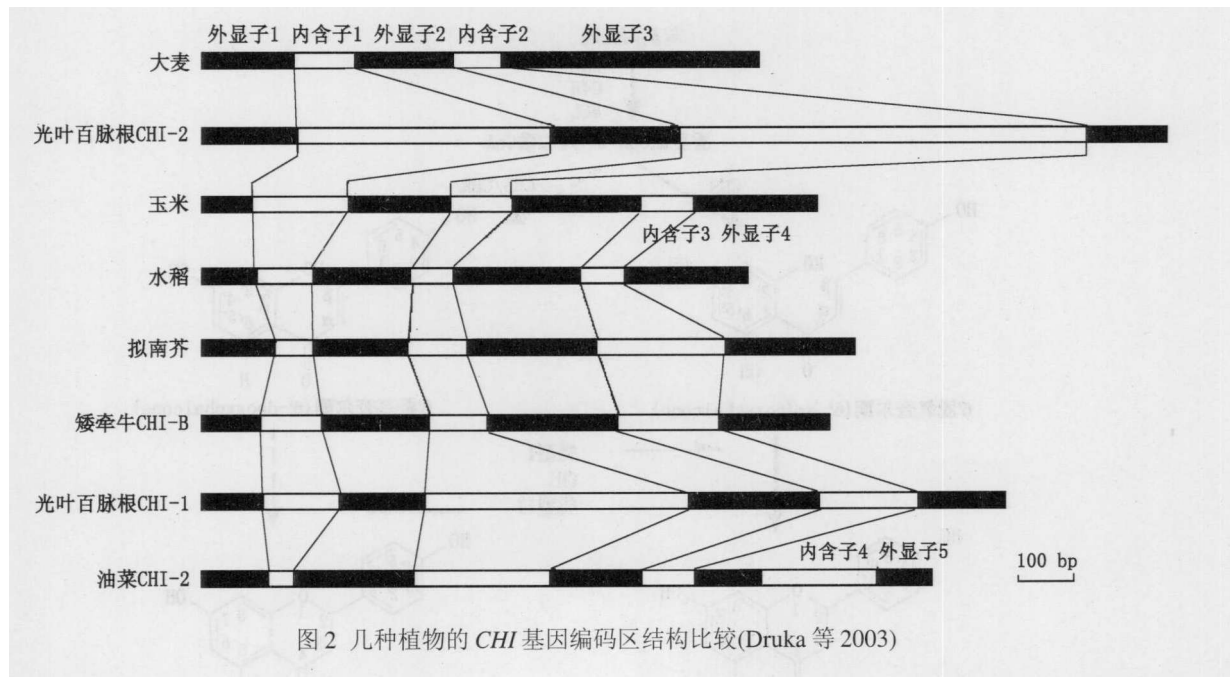


图1 植物的I型和II型CHI氨基酸多序列比对(Jez等2000和Shimada等2003)

根据从NCBI上下载典型植物的I和II型CHI序列,用Vector NTI Advance 10软件分析得到。星号表示各活性位点;圆圈表示形成活性部位的核心区域;三角符号表示可能涉及到的与底物特异性结合相关的位点。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*); 翠菊(*Citrus sinensis*); 大麦(*Hordeum vulgare*); 光叶百脉根(*Lotus japonicus*); 苜蓿(*Medicago sativa*); 水稻(*Oryza sativa*); 菜豆(*Phaseolus vulgaris*)。



有立体异构性, 并且具有 pH 依赖性, pH 为 7.5 时, 催化活性为 90%, 而在 pH 为 6.0 时的催化活性只有 50% (Jez 和 Noel 2002)。虽然这一过程可以自发发生, 但在 CHI 的催化作用下其反应速度是原来的 10^7 倍 (Bednar 和 Hadcock 1988), 而且能优先形成具有生物活性的 (2S)- 黄烷酮。

苜蓿 CHI 蛋白 (P28012) 的三维结构已被注释, 其整体形状类似于倒置的花束, 具有三明治样的折叠形式, 其核心结构由一个大的 β 片层 ($\beta 5 \sim \beta 7$ 和 $\beta 10 \sim \beta 11$) 和处于对位的 α 螺旋 ($\alpha 1 \sim \alpha 7$) 组成 (图 4), 其结构在植物中具有惟一性 (Jez 等 2000)。根据这一三维结构及突变分析, 认为在 CHI 催化反应中, T48、Y106、N113 和 T190 四个氨基酸残基的作用最重要, 它们共同构成 CHI 的核心活性中心 (Jez 等 2000)。T48 通过氢键与查尔酮相作用并可能直接参与催化反应, 而 Y106 则可能稳定与酮基氧相接触的水分子, N113 和 T190 与查尔酮 4'-羟基基团形成氢键并使酶-底物复合物活化。T48、Y106 和 N113 在不同物种中都是保守的, 但 T190 只有在豆科植物 CHI 中是保守的, 而在非豆科植物 CHI 中的第 190 位苏氨酸 (Thr) 被丝氨酸 (Ser) 取代, 其它保守的活性位点见图 1。虽然真细菌 *E. ramulus* 中的 CHI 蛋白具有异构化柚皮素、紫柳因、异甘草素为相应查尔酮的活性, 但植物中的 CHI 蛋白末梢的 α -螺旋区域包含几个可以促使植物 CHI 产生二聚作用的氨基

酸残基, 在细菌等低等生物中不含有这些氨基酸残基, 因此低等生物中虽然有类 CHI 的蛋白, 但不会形成相似的二聚物 (Herles 等 2004)。

3 CHI 基因的表达特性

来源于不同物种的 CHI 基因在不同发育期和不同部位的时空表达特性有所不同, 并具有损伤诱导表达特性。在矮牵牛中, 2 个 CHI 基因的表达方式不同, CHI-A (AF233637) 在花冠、导管、成熟的花粉和经紫外线照射的幼苗中表达, 而 CHI-B (X14590) 仅在未成熟的花粉中表达。在其花冠、球茎和花药的发育过程中, CHS-A、CHS-J 与 CHI 酶的积累和消失受光调控和紫外辐射诱导, 并存在协同性, 有人认为, 这种协同性积累效应是 CHI 基因和 CHS 基因 mRNA 协同表达的结果 (van Tunen 等 1989)。在油菜中, CHI 基因家族的 6 个成员的总体转录水平在检测的根、叶、茎、蕾、花、种子和果皮中均有表达, 以蕾中最强, 花、茎和叶中也较强, 子叶中最弱。各成员具有不同的表达特征, BnCHI-1 有较强的组织特异性, 蕾中最强, 其次是花和叶, 茎、下胚轴和叶等器官中较弱。BnCHI-2 和 BnCHI-3 在所有器官中的表达水平都可能极低, 仅在花和各发育时期的种子中有弱的表达。BnCHI-4 表现出明显的较强水平的组成型表达特点, 以蕾中为最高, 其次是花 (许本波 2006)。在豆科植物苜蓿中, CHI 在根尖和幼根中有很高的表达水平, 而

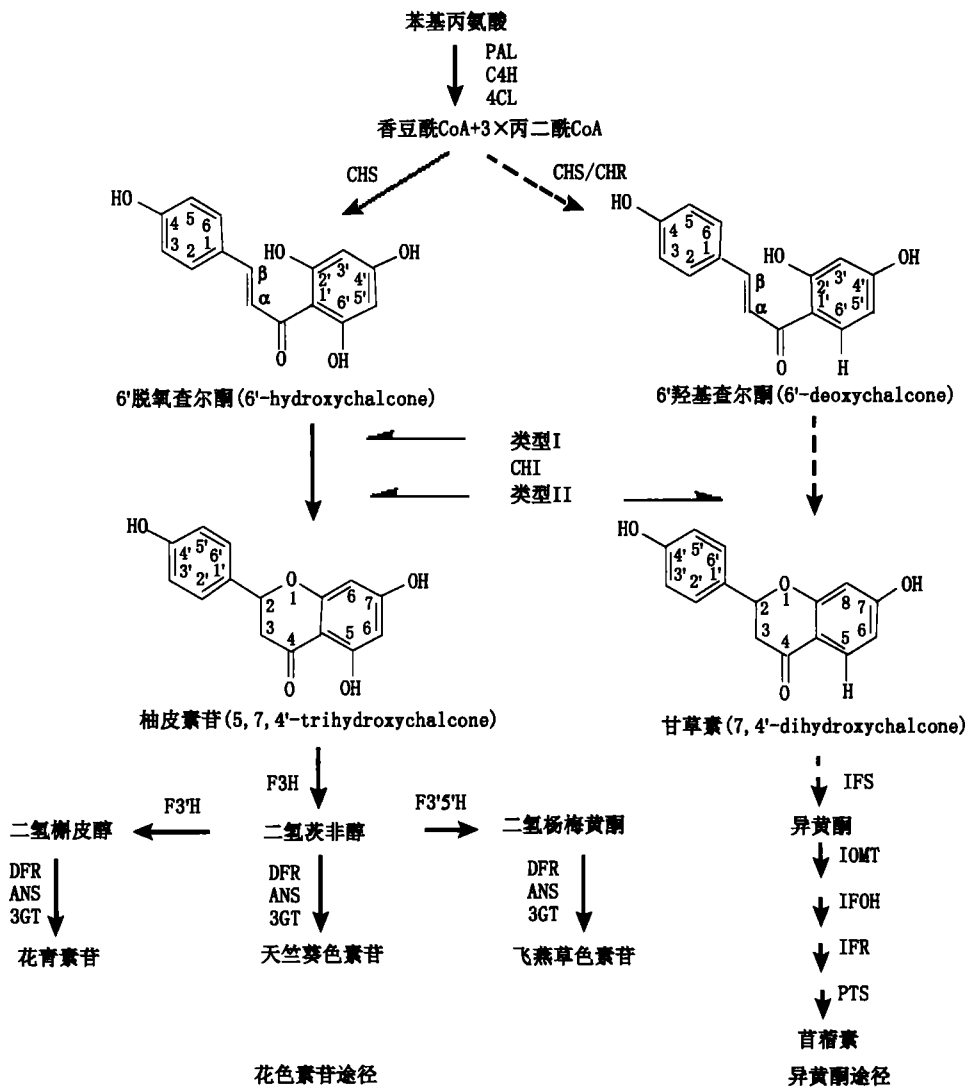


图3 花色苷和异黄酮生物合成途径(Shimada等2003)

PAL: 苯丙氨酸脱氨酶; C4H: 肉桂酸羟化酶; 4CL: 4-香豆酰 CoA 连接酶; CHS: 查尔酮合成酶; CHI: 查尔酮异构酶; F3H: 黄酮 3-羟化酶; F3'H: 类黄酮 3'-羟化酶; F3'5'H: 类黄酮 3'5'-羟化酶; DFR: 二氢黄酮醇 4-还原酶; ANS: 花色苷合成酶; 3GT: 类黄酮 3-O-糖基转移酶; IFS: 异黄酮合成酶; IFR: 异黄酮还原酶; IOMT: 异黄酮 III 基转移酶; IFOH: 异黄酮 2-羟化酶; PTS: 植保素合成酶。

子叶和花中的 *CHI* 基因只有比较低的表达水平, 损伤诱导可以导致子叶中 *CHI* 的转录水平快速提高, 和 *CHS* 也具有协同表达的特性(McKhann 和 Hirsch 1994)。在光叶百脉根中, 用还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)诱导幼苗后, 在 10 h 时 *CHI* 基因表达量达到最高, 其各成员间也存在表达差异(Shimada 等 2003)。在另外几种豆科植物中, 细胞在诱导后 3~4 h 其 mRNA 表达就可达到最大水平。真菌病原体(*Colletotrichum lindemuthianum*)感染胚轴和胚轴受到机械损伤后, 细胞内 *CHI* 基因的 mRNA 明显积累, 在受伤后感染的田菁、苜蓿和豌豆根部和根瘤处也能检测到 *CHI* 表达

(Goormachtig 等 1999; Kim 等 2005, 1997; Yang 等 1992)。

降低或抑制 *CHI* 表达活性会直接导致上游产物的积累和下游反应底物的缺乏, 从而引起颜色的变化。拟南芥中的 *CHI* 基因突变(*tt5*)会导致种皮由黑色变为无色(Koornneef 1990)。矮牵牛中编码 *CHI* 基因的 *Po* 位点突变后, 突变的花粉因查尔酮的积累而变成黄色或绿色(Bednar 和 Hadcock 1988), 而在矮牵牛花突变体中, 花药中 *CHI* 的启动子突变后使 *CHI* 表达下降, 并导致花粉颜色变成黄色或绿色(van Tunen 等 1991)。康乃馨(*Dianthus caryophyllus*)、翠菊(*C. chinensis*)和仙

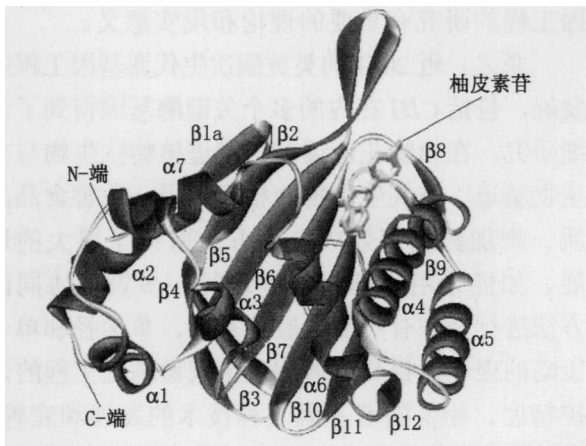


图4 用 ViewerPro Trial 4.2 软件显示的已知苜蓿 CHI 蛋白 (MsCHI, P28012) 的三维结构和底物柚皮素苷 (Naringenin) 的结合位置(Jez 等 2000)

客来(*Cyclamen persicum*)中 CHI 基因的表达活性降低后, 积累大量查尔酮, 并产生黄色的花朵 (Forkmann 和 Dangelmayr 1980; Kuhn 等 1978; Miyajima 等 1991), 而由于转座子的插入失活造成 CHI 和 DFR 的突变同样导致康乃馨的花色变为黄色 (Itoh 等 1992)。CHI 在大麦、洋葱的失活则导致黄酮含量急剧下降和查尔酮含量增加, 洋葱出

现黄色球根(Reuber 等 1997; Kim 等 2004)。上述 CHI 基因的表达特征清楚的表明, CHI 广泛参与类黄酮代谢过程, 在植物花色和其他器官颜色的形成中起作用, 它与异黄酮植保素的合成紧密相关, 并涉及到豆科植物对外界的抗胁迫能力。

4 CHI 基因的系统进化

根据一些已知的 CHI 蛋白序列, 用 ClustX 1.8 软件进行比对后, 再用 NJ 法构建不同物种 CHI 蛋白的系统进化树(图 5), 用来源于巴氏杆菌 (*Pasteurella multocida*) 的类 CHI 蛋白作为外围参考物种(outgroup)。从图 5 中可看出, 来源于细菌的类 CHI 蛋白位于最外支, 而所有植物 CHI 蛋白聚为内支, 说明两者在进化来源上存在差异, 具有相同的保守区域及活性位点的植物 CHI 蛋白均来自于同一个祖先; 另一方面, 除豆科光叶百脉根的 LjCHI-2 外, 来源于豆科的几种类型 II 的 CHI 蛋白都聚为一支, 其他非豆科的类型 II 的 CHI 蛋白都聚为另一支, 其中来源于单子叶的 CHI 蛋白又聚为一个支。由于豆科 LjCHI-2 在功能活性位点上与同科的 CHI 蛋白存在差异, 而非豆科的类型 I 的结构更为类似(图 4), 这说明不同类型的

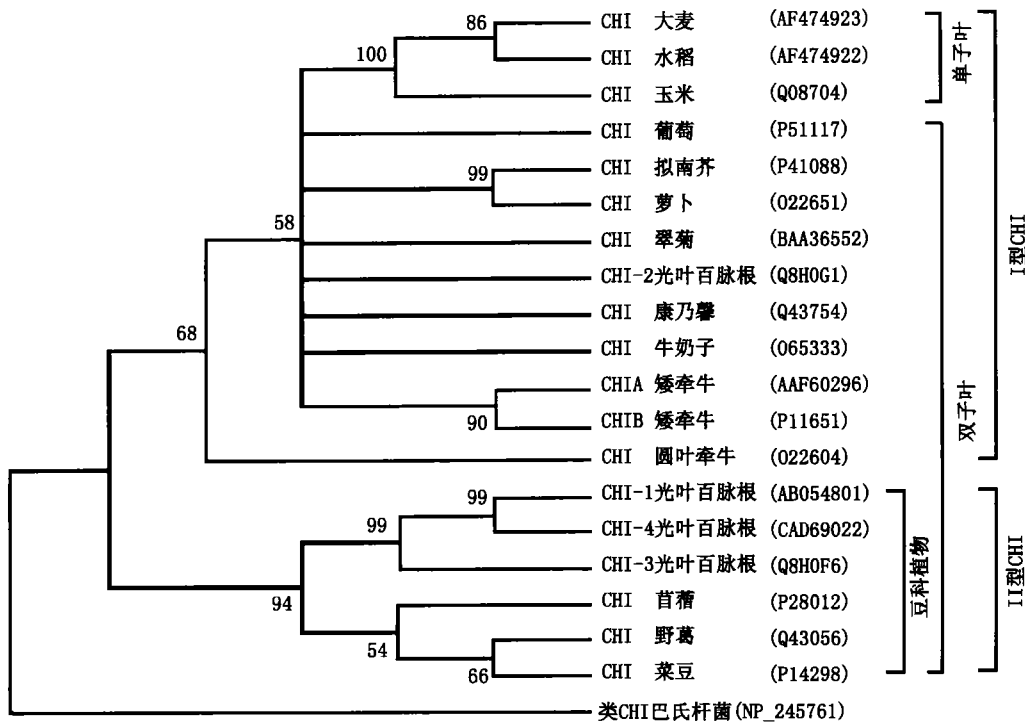


图5 用 NJ (Neighbor joining) 法构建的不同物种 CHI 氨基酸序列同源性系统进化树

康乃馨(*Dianthus caryophyllus*); 牛奶子(*Elaeagnus umbellata*); 圆叶牵牛(*Ipomoea purpurea*); 巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*); 矮牵牛(*Petunia hybrida*); 野葛(*Pueraria lobata*); 萝卜(*Raphanus sativus*); 葡萄(*Vitis vinifera*); 玉米(*Zea mays*)。其余物种的拉丁文名称见图 1。

CHI 蛋白其功能在进化上是保守的。因此, 推测进化上的 II 型的 CHI 蛋白先于 I 型蛋白出现, 当活性位点发生突变失去催化 6'-脱氧查尔酮的功能时产生 I 型 CHI 蛋白。

5 CHI 在基因工程中的应用

CHI 是第一个为人们所认识的类黄酮合成相关酶(Moustafa 和 Wong 1967), 紧接查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS), 处于类黄酮生物合成途径中的早期阶段, 对整个类黄酮次生代谢的调控十分重要。但与 CHS 的研究相比对其直接的应用研究报道还比较少, 因此有较大的研究和应用空间, 近年来已引起了人们的重视, 其应用主要集中在观赏植物的花色改良、植物药用成分提高和农作物营养成分增加等几个方面。2001 年 Muir 等报道番茄中超量表达矮牵牛 CHI-A 基因后, 其果皮中黄酮含量增加 76 倍, 果肉中黄酮醇也增加 21 倍, 且无明显的表型变化。2004 年, 祝钦波报道矮牵牛中表达来源于雪莲的 CHI 基因后, 花色发生变化, 花器官也发生变异。他们采用超量表达引发共抑制和反义抑制的方法后, 其深红色矮牵牛的颜色变浅, 并出现深色网状纹路, 部分还带有白色斑块, 柱头颜色也由原来的深绿色变成浅绿色。而在白色矮牵牛中超量表达后, 花冠边缘出现浅粉红色的纹路, 花冠中部也出现浅粉红色的斑块。2005 年, Nishihara 等用 RNAi 干扰技术抑制烟草内源 CHI 表达, 烟草的花瓣和花粉颜色变淡, 黄酮含量也有改变。2006 年李凤霞等(Li 等 2006a)将来源于雪莲的 CHI 基因在烟草中表达, 转正义结构超量表达 CHI 的转基因烟草中总黄酮含量积累显著高于非转基因的烟草, 最高的高出 6 倍, 而转反义 CHI 基因的烟草中积累的总黄酮水平较低, 两者均未观察到花色有显著变化, 在转正义 CHI 烟草中芦丁积累也很高。其原因可能是该品种烟草('W38')花瓣中的花色苷底物积累较少, 因而颜色变化不大。同年, 李凤霞等(Li 等 2006b)还将雪莲的 CHI 基因导入新疆雪莲, 得到转基因的新疆雪莲毛状根, 此种转基因毛状根合成芹菜素和总黄酮水平显著提高, 分别是非转基因植株根系的 12 倍和 4 倍, 而芹菜素和总黄酮是名贵中药的有效药用成分。这些研究表明 CHI 是黄酮代谢途径中的一个调控点, 广泛参与类黄酮的代谢调控, 对开展类黄酮代谢的基

因工程的研究有重要的理论和现实意义。

总之, 近 20 年的类黄酮次生代谢基因工程的发展, 包括 CHI 在内的多个关键酶基因得到了详细研究, 在植物花色调控、增进植物抗生物与非生物胁迫、与共生生物的相互作用、改善食品品质、增加药物有效成份等方面取得了很大的进展。如能采用多基因、多途径、多策略协同的方法进行操作有可能突破单基因、单途径和单一策略的限制, 提高类黄酮次生代谢基因工程的调控精度。相信随着基因工程技术的发展和完善, 类黄酮次生代谢基因工程定会取得更大的成就。

参考文献

- 许本波(2006). 甘蓝型油菜类黄酮途径 CHI、F3H 和 F3'H 基因家族的克隆及在黄、黑籽之间的差异表达. 西南大学博士学位论文
- 祝钦波(2004). 转查尔酮异构酶(CHI)基因矮牵牛花色改变及其花器官变异的研究. 西南农业大学硕士学位论文
- Bednar RA, Hadcock JR (1988). Purification and characterization of chalcone isomerase from soybeans, *J Biol Chem*, 263: 9582~9588
- Druka A, Kudrna D, Rostoks N, Brueggeman R, Von Wettstein D, Kleinhofs A (2003). Chalcone isomerase gene from rice (*Oryza sativa*) and barley (*Hordeum vulgare*): physical, genetic and mutation mapping. *Gene*, 302 (1~2): 171~178
- Forkmann G, Dangelmayr B (1980). Genetic control of chalcone isomerase activity in flowers of *Dianthus caryophyllus*. *Biochem Genet*, 18: 519~527
- Gensheimer M, Mushegian A (2004). Chalcone isomerase family and fold: no longer unique to plants. *Protein Sci*, 13 (2): 540~544
- Goormachtig S, Lievens S, Herman S, van Montagu M, Holsters M (1999). Chalcone reductase-homologous transcripts accumulate during development of stem-borne nodules on the tropical legume *Sesbania rostrata*. *Planta*, 209: 45~52
- Herles C, Braune A, Blaut M (2004). First bacterial chalcone isomerase isolated from *Eubacterium ramulus*. *Arch Microbiol*, 181: 428~434
- Itoh Y, Higeta D, Suzuki A, Yoshida H, Ozeki Y (1992). Excision of transposable elements from the chalcone isomerase and dihydroflavonol 4-reductase genes may contribute to the variegation of the yellow-flowered carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Plant Cell Physiol*, 43: 578~585
- Jez JM, Bowman ME, Dixon RA, Noel JP (2000). Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase. *Nat Struct Biol*, 7: 786~791
- Jez JM, Noel JP (2002). Reaction mechanism of chalcone isomerase pH dependence, diffusion control, and product binding differences. *J Biol Chem*, 277 (2): 1361~1369
- Kim HK, Jang YH, Baek IS, Lee JH, Park MJ, Chung YS, Chung JI, Kim JK (2005). Polymorphism and expression of

- isoflavone synthase genes from soybean cultivars. *Mol Cells*, 19: 67~73
- Kim S, Jones R, Yoo KS, Pike LM (2004). Gold color in onions (*Allium cepa*): a natural mutation of the chalcone isomerase gene resulting in a premature stop codon. *Mol Genet Genomics*, 272: 411~419
- Koornneef M (1990). Mutations affecting the testa colour in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Inf Serv*, 27: 1~4
- Kuhn B, Forkmann G, Seyfert W (1978). Genetic control of chalcone-flavanone isomerase activity in *Callistephus chinensis*. *Planta*, 38: 199~203
- Li FX, Jin ZP, Qu WQ, Zhao DX, Ma FS (2006a). Cloning of a cDNA encoding the *Saussurea medusa* chalcone isomerase and its expression in transgenic tobacco. *Plant Physiol Biochem*, 44: 455~461
- Li FX, Jin ZP, Zhao DX, Cheng LQ, Fu CX, Ma FS (2006b). Overexpression of the *Saussurea medusa* chalcone isomerase gene in *Saussurea involucrata* hairy root cultures enhances their biosynthesis of apigenin. *Phytochem*, 67: 553~560
- Lukaszewicz M, Matysiak Kata I, Skala J, Fecka I, Cisowski W, Szopa J (2004). Antioxidant capacity manipulation in transgenic potato tuber by changes in phenolic compounds content. *Agr Food Chem*, 52 (6): 1526~1533
- McKhann HI, Hirsch AM (1994). Isolation of chalcone synthase and chalcone isomerase cDNAs from alfalfa (*Medicago sativa* L.): highest transcript levels occur in young roots and root tips. *Plant Mol Biol*, 24: 767~777
- Mckhann HI, Paiva NL, Dixon RA, Hirsch AM (1997). Chalcone synthase transcripts are detected in alfalfa root hairs following inoculation with wild-type *Rhizobium meliloti*. *Mol Plant-Microb Interact*, 10: 50~58
- Mehdy MC, Lamb CJ (1988). Chalcone isomerase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding and infection. *EMBO J*, 6: 1527~1533
- Miyajima I, Maehara T, Kage T, Fujieda K (1991). Identification of the main agent causing yellow color of yellow-flowered cyclamen mutant. *J Jpn Soc Hort Sci*, 60: 409~414
- Moustafa E, Wong E (1967). Purification and properties of chalcone-flavanone isomerase from soya bean seed. *Phytochemistry*, 6: 625~632
- Muir SR, Collins GJ, Robinson S, Hughes S, Bovy A, Ric De Vos CH, van Tunen AJ, Verhoeven ME (2001). Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruits containing increased levels of flavonols. *Nat Biotechnol*, 19: 470~474
- Nishihara M, Nakatsuka T, Yamamura S (2005). Flavonoid components and flower color change in transgenic tobacco plants by suppression of chalcone isomerase gene. *FEBS Lett*, 579 (27): 6074~6078
- Reuber S, Jende-Strid B, Wray V, Weissenböck G (1997). Accumulation of the chalcone isosalipurposide in primary leaves of barley flavonoid mutants indicates a defective chalcone isomerase. *Physiol Plant*, 101: 827~832
- Shimada N, Aoki T, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Ayabe S (2003). 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*. *Plant Physiol*, 131: 941~951
- van Tunen AJ, Koes RE, Spelt CE, van der Krol AR, Stuitje AR, Mol JN (1988). Cloning of the two chalcone flavanone isomerase genes from *Petunia hybrida*: coordinate, light-regulated and differential expression of flavonoid genes. *EMBO J*, 7: 1257~1263
- van Tunen AJ, Hartman SA, Mur LA, Mol JN (1989). Regulation of chalcone flavanone isomerase (CHI) gene expression in *Petunia hybrida*: the use of alternative promoters in corolla, anthers and pollen. *Plant Mol Biol*, 12: 539~551
- van Tunen AJ, Mur LA, Recourt K, Gerats AG, Mol JN (1991). Regulation and manipulation of flavonoid gene expression in anthers of petunia: the molecular basis of the *Po* mutation. *Plant Cell*, 3: 39~48
- Yang WC, Cremers HCJC, Hogendijk P, Katinakis P, Wijffelman CA (1992). *In-situ* localization of chalcone synthase mRNA in pea root nodule development. *Plant J*, 2: 143~151
- Ye X, Al-Babili S, Klott A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I (2000). Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, 287: 303~305