

• 药材与资源 •

款冬叶不同发育阶段的转录组学分析

聂佳慧^{1,2}, 张福生¹, 田 栋^{1,2}, 郭 冬³, 雷振宏³, 秦雪梅¹, 李震宇^{1*}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

3. 山西振东集团, 山西 长治 047100

摘要: **目的** 比较不同生长时期款冬叶中苯丙素类成分生物合成相关基因的表达, 推测苯丙素类成分的最佳合成积累时期, 为款冬叶资源的合理利用提供科学依据。 **方法** 利用 Illumina HiSeq2500 测序技术对不同时期的款冬叶进行转录组测序, 获得转录组数据后进行基因功能注释等生物信息学分析, 对苯丙素类生物合成相关基因在不同时期的表达进行比较。 **结果** 通过转录组测序技术获得 46 793 个 Unigenes, 平均长度为 952.144 8 bp, 其中有 4 774 个可以被 NR、Swiss-Prot、eggNOG、GO、KEGG 等公共数据库共同注释。对注释得到的 Unigenes 进行 KEGG 代谢通路分析, 结果显示款冬叶转录组中有 144 条 Unigenes 参与萜类、黄酮类和苯丙素类生物合成, 其中萜类 65 条, 苯丙素类 64 条, 黄酮类 15 条。进一步对参与苯丙素类生物合成相关基因进行动态比较, 发现其关键酶 PAL、4CL、HCT、CCoAOMT 等在 9 月的表达量最高, 即苯丙素类成分在 9 月的生物合成量可能最高。 **结论** 为苯丙素类成分的生物合成途径及调控分析奠定了基础, 也为款冬叶资源的开发利用奠定了科学依据。

关键词: 款冬; 转录组; 功能基因; 代谢通路; 苯丙素类化合物**中图分类号:** R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)13-3095-07**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.13.021Comparative transcriptomic analysis of leaves of *Tussilago farfara* in different development stagesNIE Jia-hui^{1,2}, ZHANG Fu-sheng¹, TIAN Dong^{1,2}, GUO Dong³, LEI Zhen-hong³, QIN Xue-mei¹, LI Zhen-yu¹

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

3. ZhenDong Group, Changzhi 047100, China

Abstract: **Objective** To compare the expression of genes in the leaves of *Tussilago farfara* that involved in biosynthesis of phenylpropanoids in different developmental stages, and infer the accumulation period of biosynthesis of phenylpropanoids and provide a scientific basis for the resource utilization of leaves of *T. farfara*. **Methods** The Illumina HiSeq2500 highthroughput sequencing method was used to analyze the transcriptome of the leaves of *T. farfara* in different periods. After obtaining transcriptome data, bioinformatics analysis of gene function annotation was performed to compare the expression of genes related to phenylpropanoid biosynthesis in different periods. **Results** A total of 46 793 unigenes were obtained by transcriptome sequencing and the average length was 952.144 8 bp. Among them, 4 774 unigenes were annotated in the public databases NR, Swiss-Prot, eggNOG, GO, and KEGG. According to the assignment of KEGG pathway, 144 unigenes were involved in terpenoid biosynthesis, phenylpropanoid biosynthesis and flavonoids, 65 unigenes were involved in terpenoid biosynthesis, 64 unigenes were involved in phenylpropanoid and 15 unigenes were involved in flavonoids biosynthesis. The enzyme genes involved in the phenylpropanoid biosynthesis were also compared in different development stages, and the results indicated that the expression of PAL, 4CL, HCT, and CCoAOMT, which were closely related to biosynthesis of phenylpropanoids, were highest in September, which means that the contents of these compounds might be highest in September. **Conclusion** This study lays the foundation for the biosynthetic pathway and regulation analysis of phenylpropanoids, and provides a scientific basis for the development and the resource utilization of leaves of *T. farfara*.

Key words: *Tussilago farfara* L.; transcriptome; functional genes; biochemical pathway; phenylpropanoids**收稿日期:** 2018-04-09**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(31270008); 国家中药标准化项目(ZYBZH-Y-JIN-34); 山西省科技创新重点团队(201605D131045-18); 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室(201605D111004)**作者简介:** 聂佳慧(1994—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药活性成分。E-mail: niejhsxu@163.com***通信作者** 李震宇, 男, 博士, 教授, 主要从事中药质量控制及活性成分研究。E-mail: lizhenyu@sxu.edu.cn

款冬 *Tussilago farfara* L. 为菊科款冬属多年生草本植物,在我国主要分布于东北、华北、华东、西北等地。款冬花具有润肺下气、止咳化痰等功效,主要用于治疗支气管炎、咳嗽、哮喘等疾病^[1]。款冬叶在欧洲也是一种广泛使用的止咳化痰传统草药。款冬花中含有三萜、倍半萜、黄酮、苯丙素、生物碱等化学成分^[2],而对款冬叶的系统化学成分研究目前未见报道。课题组曾经采用代谢组学的指纹轮廓分析技术对款冬花和叶进行了比较^[3-4],结果显示款冬叶和花具有相似的化学成分,其中苯丙素类在款冬叶中含量较高,而且苯丙素类成分与款冬花的镇咳祛痰作用密切相关^[5]。

近年来随着第二代高通量测序技术(next generation sequencing, NGS)的不断发展,药用植物功能基因组学研究工作也不断涌现新思路和新方法。由于高通量转录组测序技术能够确定基因序列和转录本,在没有参考基因时,可以对某一物种的转录组和基因组进行细致全面的分析,为基因组图谱尚未完成或数据信息匮乏的物种的基因组和转录组研究提供技术支持^[6]。目前,这种技术已广泛应用于丹参^[7]、人参^[8]、金银花^[9]和黄芪^[10]等。本研究拟在前期对款冬叶化学初步研究的基础上,采用转录组测序的方法对不同时期款冬叶进行分析。通过款冬叶中基因表达的动态变化,对款冬叶中苯丙素类成分的合成积累规律进行分析,为款冬叶中苯丙素类成分的生物合成、代谢途径、调控机制,以及资源利用研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

分别于 2014 年 5 月 21 日、2014 年 7 月 23 日,2014 年 9 月 23 日和 2014 年 10 月 20 日在山西沁县采集款冬植物新鲜叶片,样品经山西大学秦雪梅教授鉴定为菊科植物款冬 *Tussilago farfara* L. 的叶。4 个不同时期的款冬叶样品分别标记为 I、II、III、IV 期,以铝箔纸包裹液氮速冻后于 -80 ℃ 保存。临用前随机选取同时期样本 6 株混合,液氮研磨后用于 RNA 提取,标本保存于山西大学中医药现代研究中心。Trizol (Takara 公司),DEPC 处理水 [(生工生物工程(上海)股份有限公司)]。

1.2 总 RNA 的提取与分离及转录组测序

款冬叶总 RNA 的提取方法采用 Trizol 法。将上述不同时期的款冬叶样本随机选取 6 株混合,用液氮研磨成粉末后将 Trizol 加到款冬叶中,再加入

20% 氯仿,涡旋 15 s,室温静置 15 min。12 000 r/min 下离心 10 min (4 ℃) 后取上清。上清液转移至另一离心管,加入异丙醇沉淀 RNA,室温静置 10 min。12 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 75% 乙醇洗涤 1~2 次,涡旋震荡 4 ℃,7 500 r/min 离心 5 min。自然干燥 10 min,加入 DEPC 处理水,移液枪吹打几次后对其浓度定量,达到进行 RNA-seq 实验的标准后,进行下一步操作。

通过化学试剂和高温的方法,使 mRNA 片段化。将所获得的片段化 mRNA 逆转录合成为 cDNA,并进行 PCR 扩增,即可得到 cDNA 文库。之后,通过荧光分光光度计以及 Pico green 对 cDNA 文库进行定量,检测后使用 Illumina HiSeq2500 2×126 bp 和 NextSeq500 2×150 bp (Illumina, 美国) 测序平台进行测序。

1.3 转录组数据组装及 Unigenes 功能注释

通过对原始测序数据进行统计和质量评估,去除含有接头污染的序列。对经过上述步骤处理得到的数据进行质量控制,即可得到高质量序列碱基数(clean data)。使用 Trinity 软件^[11]进行 de novo 拼接得到 contigs, transcripts 和 Unigenes。通过 BLAST 软件 (version 2.2.30+) 对聚类得到的 Unigenes 进行基因功能注释。基因功能注释所用到的数据库包括 NR (NCBI non-redundant protein sequences)、GO (gene ontology)、KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genome)、eggNOG (evolutionary genealogy of genes: Non-supervised orthologous groups) 和 Swiss-Prot。通过 GO 数据库和 eggNOG 数据库对款冬叶中的基因进行功能分类,通过 KEGG 数据库分析基因可能参与的生物学通路。

1.4 Unigenes 结构分析

采用 Varscan (version 2.3.7) 程序获取 cSNP 位点。为了保证后续分析质量,对 cSNP 按测序深度 ≥ 8、突变碱基测序深度 ≥ 2、碱基质量 ≥ 20、 $P \leq 0.01$ 等条件进一步筛选。

1.5 差异表达分析及苯丙素类生物合成预测

通过数字基因表达谱 (digital gene expression profiling, DGE) 对款冬叶不同发育时期的差异表达基因进行两两比较 (II/I、III/II、IV/III), 表达量的高低通过样品标准化后的 Reads Per Kilobase per Million mapped reads (RPKM) 值来比较。根据表达量倍数差异 (> 2 倍) 和差异表达显著性 ($P < 0.05$) 筛选出差异表达显著的非重复序列基因。

2 结果

2.1 款冬叶转录组测序结果与数据组装

对原始数据进行除杂处理之后, 获得了 4 个不同时期款冬叶的 reads 片段, 数目分别为 39 265 198、19 889 388、42 578 430、20 305 898, 分别包含了 3 891 935 616、2 461 831 933、5 253 202 709、2 735 858 597 个核苷酸序列信息; 将经过质量控制后得到的高质量

序列进行 de novo 拼接。结果显示, 拼接得到的总 Unigene 片段达到 46 794 条, 平均长度为 952.144 8 bp, 最长的 Unigene 片段为 15 590 bp, N50 为 1 614 bp。在拼接得到的 46 793 条 Unigenes 片段中, 长度在 200~299 bp 的片段最多, 达 11 378 条, 其次是长度在 300~399 bp 和 400~499 bp 左右的片段, 分别为 6 328 条和 3 918 条 (图 1)。

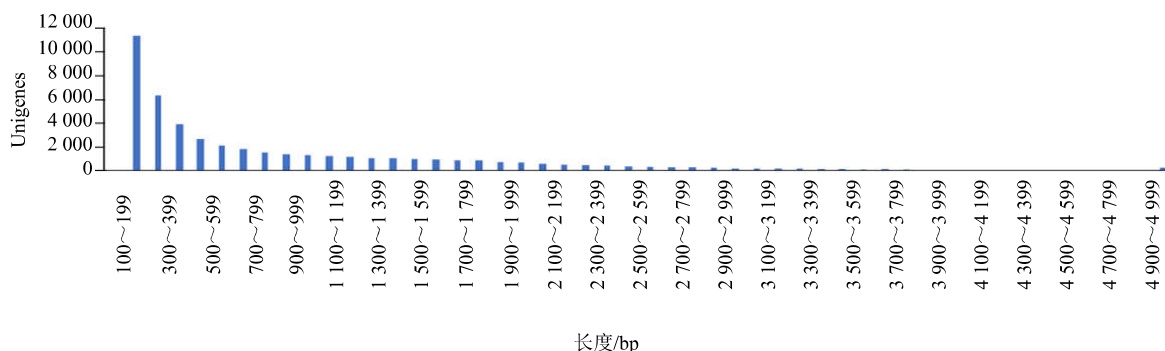


图 1 Unigenes 长度分配

Fig. 1 Length distribution of unigenes in leaves of *T. farfara*

2.2 基因功能注释

2.2.1 基因功能注释 对聚类得到的 Unigenes 进行基因功能注释 (表 1), 所有 Unigenes 均能在 NR 数据库中得到注释; 能在 GO 数据库得到注释的有 28 130 个, 占总数的 60.11%; 能在 KEGG 数据库注释的有 5 677 个, 占总数的 12.13%; 能在 eggNOG 数据库注释的有 45 405 个, 占总数的 97.03%; 能在 Swiss-Prot 数据库中得到注释的有 35 814 个, 占总数的 76.54%。

表 1 款冬叶 Unigenes 基因注释结果统计

Table 1 Summary statistics of Unigenes functional annotation for *T. farfara* transcriptome

注释数据库	Unigenes 数量	百分比/%
NR	46 794	100.00
GO	28 130	60.11
KEGG	5 677	12.13
eggNOG	45 405	97.03
Swiss-Prot	35 814	76.54
In all database	4 774	10.20

2.2.2 GO 分类 GO 是一个国际化的基因功能分类体系, 可以提供一套动态更新的标准词汇表 (controlled vocabulary) 来全面描述生物体中基因和基因产物的属性。本研究将不同生长时期款冬叶转录组获得的 Unigenes 与 GO 功能数据库进行比对分析, 发现有 28 130 个 Unigenes 与数据库中的基因具有相似性, 得到了它们的注释和分类。款冬叶转录组中的

Unigenes 根据 GO 功能数据库大致分为生物过程、细胞组分和分子功能 3 个大类 53 个分支 (图 2)。通过对每一类的 Unigenes 数量进行统计分析, 发现在生物过程这一大类中, 代谢过程涉及的 Unigenes 有 20 537 个, 占总体的 15.23%, 是该类别中数目最多、占比最大的一类, 其次是细胞过程中有 17 018 个 Unigenes, 占总体的 12.62%; 在细胞组分这一大类中, 涉及细胞部分的 Unigenes 最多, 达 12 840 条, 占总体的 9.52%, 其次是细胞内, 涉及 Unigenes 11 846 条, 占总体的 8.78%; 在分子功能这一大类中, 参与黏合功能的 Unigenes 最多, 达 13 775 条, 其次是结构分子活性, 涉及 Unigenes 为 1 459 条。

2.2.3 KEGG 代谢途径分类 根据 KEGG 数据库, 将款冬叶转录组中的数据分成 6 大类 42 种代谢通路, 6 大类分别为代谢、遗传信息处理、环境信息处理、细胞过程、生物系统和人类疾病, 42 小类包括碳水化合物代谢、脂质代谢、核苷酸代谢、萜类化合物和聚酮化合物的代谢、其他次生代谢物的生物合成、基因转录、基因翻译、细胞生长和死亡等, 共涉及 Unigenes 5 677 条。代谢这一类别分配了 3 112 条, 人类疾病分配了 1 527 条, 遗传信息处理分配了 1 481 条, 生物系统分配了 1 116 条, 细胞过程分配了 711 条, 以及有 687 条 Unigenes 分配到了环境信息处理 (图 3)。

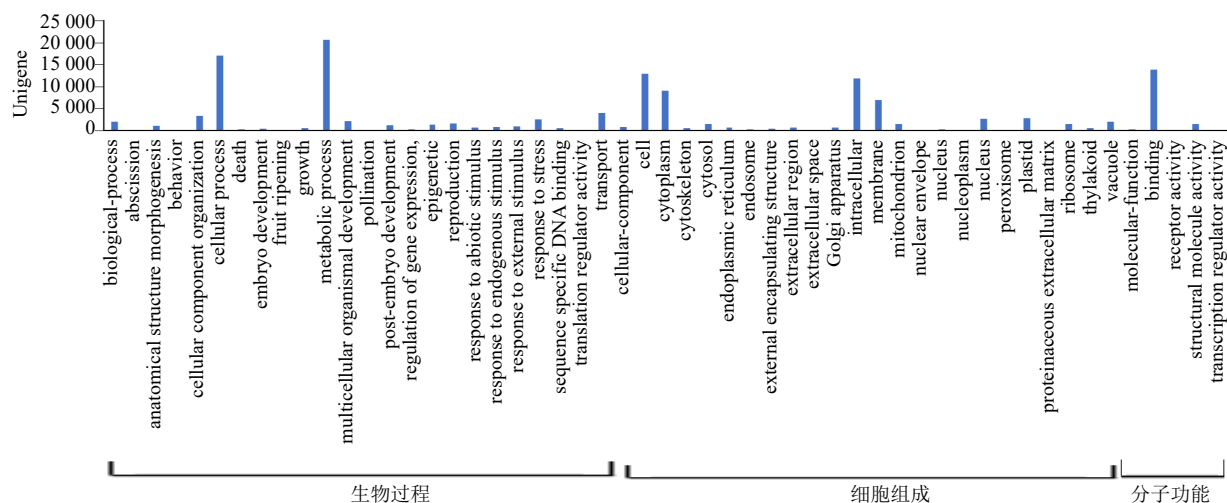


图 2 款冬叶转录组的 Unigene GO 功能分类

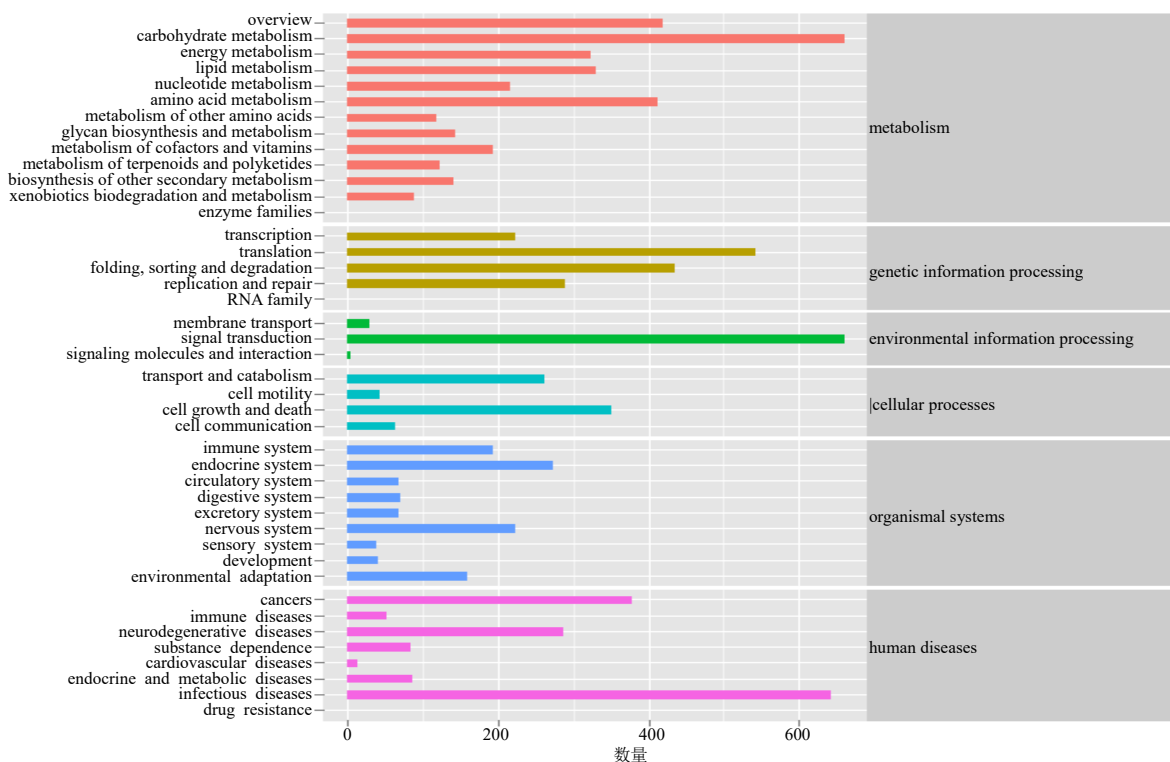
Fig. 2 Unigene GO functional classification of transcriptome in leaves of *T. farfara*

图 3 款冬叶转录组 Unigene KEGG 的代谢途径分类

Fig. 3 KEGG classification of Unigene in transcriptome in leaves of *T. farfara*

在被分配到代谢这一大类的 Unigenes 中, 有 659 条分配到了碳水化合物代谢, 数目最多; 其次是信号转导, 分配了 658 条; 氨基酸代谢有 438 条; 萜类 (包括了单萜、二萜、三萜、倍半萜) 涉及的基因有 65 条, 苯丙素类涉及的基因共有 64 条, 黄酮类涉及的基因有 15 条, 共涉及的基因 144 条。

2.2.4 eggNOG 功能分类 将款冬叶转录组的

Unigenes 片段与 eggNOG 数据库进行比对, 发现共有 52 339 条 Unigenes 与 eggNOG 数据库中的基因具有相似性。根据功能将款冬叶转录组中的 Unigenes 大致分为 26 类, 并对每一类的基因数量进行统计。结果显示, Unigenes 的 eggNOG 功能种类比较全面, 涉及到大多数的生命活动, 所含基因数目最多的是一般功能预测, 有 10 110 条基因被划分到一般功能预测, 其

次是功能未知 (9 687 条), 翻译后修饰、蛋白质转换、伴侣 (3 990 条), 信号转导机制 (3 924 条), 翻译、核糖体结构和生物合成 (3 034 条), 碳水化合物转运和代谢 (2 421 条), 能量生产和转换 (1 977 条) 等, 各基因的表达丰度见表 2。

2.2.5 cSNP 分析 SNP (single nucleotide polymorphisms) 是指在基因组上由单个核苷酸变异形成的遗传标记, SNP 发生的变换有转换和颠换 2 种, 且 SNP 是指变异频率大于 1% 的单核苷酸变异。cSNP (coding SNP) 表示蛋白编码区域的 SNP。本研究中共 cSNP 的数量为 549 264 个, T/G 和 T/C 发生频率最高, 分别为 32 % 和 31.6%, 其他 4 种单核苷酸变异 A/G、A/T、A/C、C/G 发生频率均在 15% 以下, 分别为 9%、12.5%、5.8% 和 9% (图 4)。

2.3 款冬叶中苯丙素类化合物的差异分析和生物合成预测

将所获得的不同生长时期的款冬叶的 DEG 原始数据按 II/I、III/II、IV/III 分组并进行滤过、拼接, 可以得到总 contig 数 781 136 条, 总 transcript 数 312 757 条, 非重复序列基因 46 793 条。不同时期的款冬叶的

表 2 款冬叶转录组的 Unigene eggNOG 功能分类
Table 2 eggNOG function classification of transcriptome in leaves of *T. farfara*

功能分类	基因数量/个	百分比/%
RNA 加工和修饰	1 348	2.58
染色质结构和动力学	463	0.88
能量生产和转换	1 977	3.78
细胞周期调控、细胞分裂、染色体分割	637	1.22
氨基酸的运输和代谢	1 295	2.47
核苷酸转运和代谢	362	0.69
碳水化合物转运和代谢	2 421	4.63
辅酶转运和代谢	561	1.07
脂类运输和代谢	1 417	2.71
翻译、核糖体结构和生物合成	3 034	5.80
转录	3 021	5.77
复制、重组和修复	1 371	2.62
细胞壁、膜的发生	542	1.04
细胞活力	11	0.02
翻译后修饰、蛋白质周转、伴侣	3 990	7.62
无机离子转运与代谢	1 341	2.56
次生代谢产物的生物合成、运输和代谢	1 641	3.14
一般功能预测	10 110	19.32
功能未知	9 687	18.51
信号转导机制	3 924	7.50
细胞内转运、分泌和小泡运输	1 676	3.20
防御机制	342	0.65
胞外结构	128	0.24
未确定	0	0.00
核结构	124	0.24
细胞骨架	916	1.75

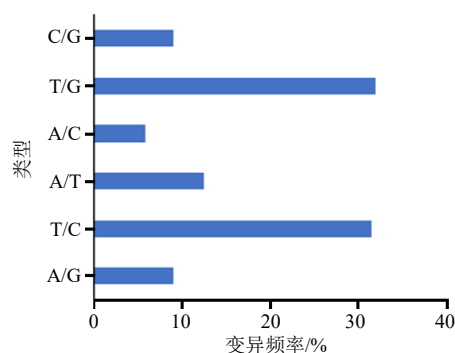


图 4 款冬叶转录组中序列中 cSNP 统计情况

Fig. 4 cSNP statistics of transcriptome in leaves of *T. farfara*

两两比较结果表明: (1) II/I: 显著基因共有 1 582 条, 上调 1 399 条, 下调 243 条; (2) III/II: 显著基因共有 1 442 条, 上调 346 条, 下调 1 096 条; (3) IV/III: 显著基因共有 1 540 条, 上调 570 条, 下调 970 条。图 5-A 为不同生长时期款冬叶上调基因与下调基因的分布情况。II/I 中差异表达基因上调的数目明显高于 III/II、IV/III, 下调的基因数目则低于 III/II、IV/III, 表明款冬花在 II 期的基因表达数目最高, 原因在于此时叶子的生长最为旺盛, 生命活动最为剧烈。当 III 期与 II 期比较时, III 期的下调基因多于上调基因, 当 IV 期与 III 期比较时, IV 期下调基因数目多于上调基因, 说明从 III 期开始款冬叶的基因表达逐渐减弱。

为了从整体上了解差异表达基因在款冬叶不同生长阶段的表达情况, 将 II/I、III/II、IV/III 的全部差异表达的基因通过 Cluster 3.0 进行基因与样品间的聚类分析。从图 5-B 可以看出, 在 I、II、III、IV 期款冬叶样品中的差异表达基因主要分为高表达 (红色) 与低表达 (绿色) 基因 2 类, 从 I 期到 IV 期, 款冬叶中差异表达基因有明显波动 (上调或下调); 根据各个阶段基因表达量高低, 可以看出, I、II、III 期聚为一类, IV 期另归一类; IV 期的低表达基因与另外 3 期明显不同, III 期的高表达基因最多。

由 KEGG 注释结果可知, 与苯丙素类成分生物合成相关的酶包括: 苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL)、 β -葡萄糖苷酶 (beta-glucosidase, bgIX)、肉桂醇脱氢酶 (cinnamyl-alcohol dehydrogenase, CAD)、4-香豆酸辅酶 A 连接酶 (4-coumarate CoA ligase, 4CL)、莽草酸羟基肉桂酰转移酶 (hydroxycinnamoyl-transferase, HCT)、咖啡酸-O-甲基转移酶 (caffeic acid 3-O-methyltransferase, COMT)、过氧化物酶

(peroxidase, PER)。

为分析上述酶的基因表达情况, 通过比较 RPKM (Reads Per Kilo bases per Million reads) 的值来分析上述限速酶在不同生长发育阶段的表达量。如图 6 所示, PAL、4CL、HCT、CCoAOMT 的表达量呈现先增高后减少的趋势, 即这些基因在

叶片生长发育的过程中表达量不断增多, 9 月达到最大。CAD 的表达量在款冬叶发育过程中虽然有波动, 但 5、9、10 月的表达量差异不大, 仅在 7 月最低。COMT 的表达量在款冬叶的生长发育过程中呈波动性变化, 在 10 月表达量达到最高。bgIX 的表达量随款冬叶的生长呈逐渐下降的趋势。根据上

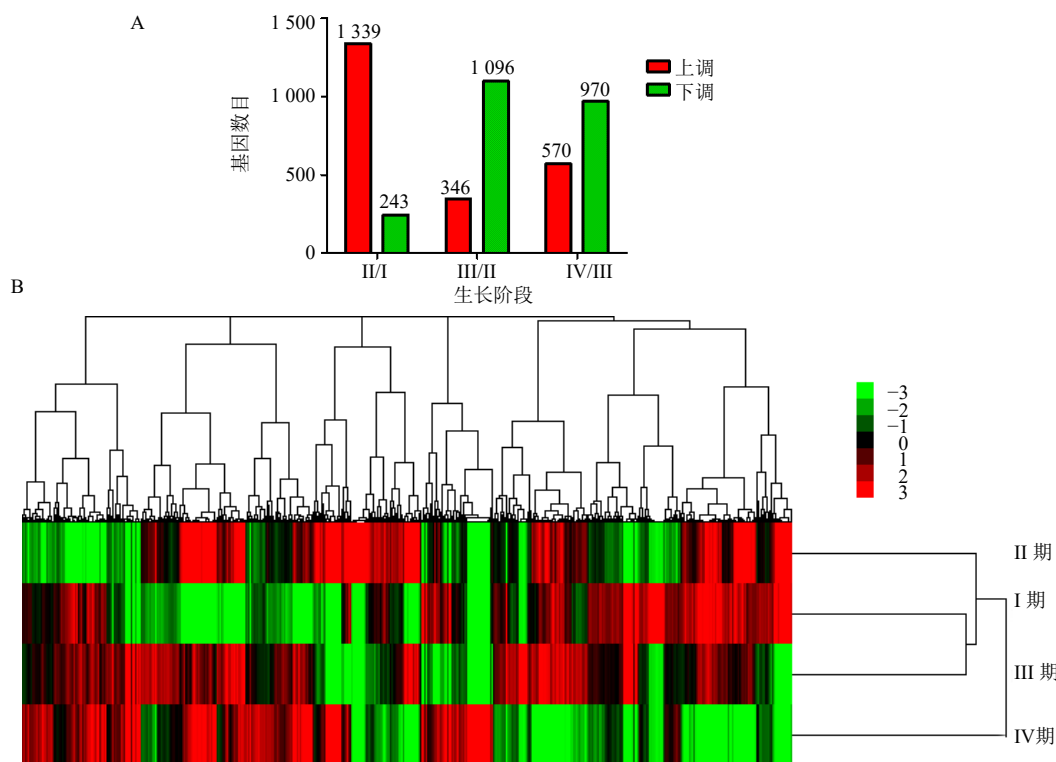


图 5 款冬叶差异表达基因的分布 (A) 和聚类分析 (B)

Fig. 5 Distribution diagram (A) and cluster analysis diagram (B) of differentially expressed unigenes in leaves of *T. farfara*

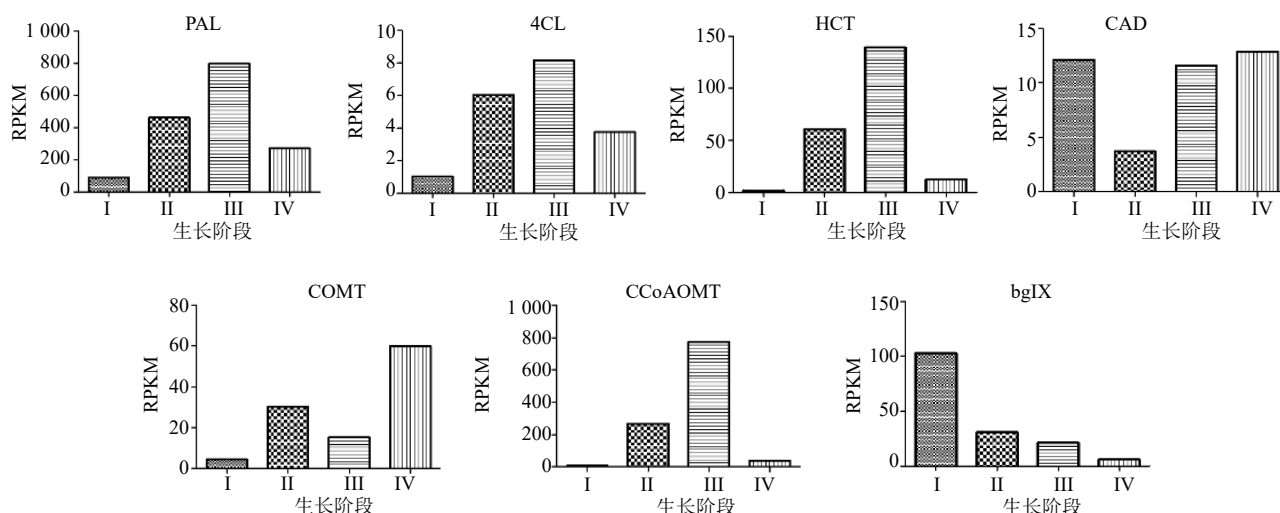


图 6 款冬叶关键酶的表达量比较

Fig. 6 Quantitative comparison on key enzymes in leaves of *T. farfara*

述基因表达量的变化趋势可以推测款冬叶中苯丙素类成分可能在9月份的合成量最多。

3 讨论

本研究采用转录组测序技术对不同生长时期款冬叶中苯丙素类成分生物合成相关基因的表达进行了比较。通过转录组测序技术共获得46 793个的Unigenes, 4 774个Unigenes可在NR、Swiss-Prot、eggNOG、GO、KEGG等数据库中得到共同注释。KEGG分析结果显示, 涉及萜类、黄酮类和苯丙素类的基因共有144条, 其中萜类65条, 苯丙素类64条, 黄酮15条。对参与苯丙素类生物合成相关基因进行动态分析比较, 关键酶PAL、4CL、HCT、CCoAOMT等在9月的表达量最高, 提示苯丙素类成分在9月的生物合成量可能最高。

款冬植物在中国和欧洲都是用于止咳化痰的药用植物, 我国传统中医药使用的药用部位是花蕾, 而欧洲使用的是叶。课题组前期已对款冬花进行了比较转录组分析^[6]。前期研究显示款冬叶与花蕾有相似的成分^[12], 但苯丙素类成分在叶中含量更高, 而款冬酮等倍半萜成分在花蕾中含量较高。苯丙素类在高等植物体内均由莽草酸途径而来, 莽草酸衍生的苯丙氨酸在苯丙氨酸解氨酶(PAL)催化下转化为反式肉桂酸, 从而将代谢流引向苯丙素类次生代谢途径^[13]。前期研究提示, 苯丙素类成分与款冬花的止咳化痰作用密切相关, 本研究所揭示的苯丙素类在款冬叶中的动态积累规律为款冬叶资源的合理利用提供了科学依据。以款冬酮为代表的倍半萜类是款冬植物的专属性成分, 然而这类成分的生物合成途径以及所涉及的关键酶目前尚不清楚, 难以对其在款冬叶中的动态积累规律进行分析。此外, 由于款冬叶中以苯丙素类成分为主, 而款冬酮等倍半萜类成分在叶中含量较低, 因此本研究将苯丙素类作为款冬叶的研究重点, 下一步将对款冬叶中苯丙素类成分的含量动态变化进行化学分析。

参考文献

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2015.
[2] 吴琪珍, 张朝凤, 许翔鸿, 等. 款冬花化学成分和药理

活性研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2015(2): 33-36.

- [3] Xue S Y, Li Z Y, Zhi H J, et al. Metabolic fingerprinting investigation of *Tussilago farfara* L. by GC-MS and multivariate data analysis [J]. *Biochem System Ecol*, 2012, 41(1): 6-12.
[4] Zhi H J, Qin X M, Sun H F, et al. Metabolic fingerprinting of *Tussilago farfara* L. using ¹H-NMR spectroscopy and multivariate data analysis [J]. *Phytochem Anal*, 2012, 23(5): 492-501.
[5] Li Z Y, Zhi H J, Zhang F S, et al. Metabolomic profiling of the antitussive and expectorant plant *Tussilago farfara* L. by nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate data analysis [J]. *J Pharm Biom Anal*, 2013, 75(5): 158-164.
[6] 贾岩, 张福生, 肖淑贤, 等. 款冬花不同发育阶段的代谢组学和比较转录组学分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2017, 33(6): 615-623.
[7] Xu Z, Peters R J, Weirather J, et al. Full-length transcriptome sequences and splice variants obtained by a combination of sequencing platforms applied to different root tissues of *Salvia miltiorrhiza* and tanshinone biosynthesis [J]. *Plant J*, 2015, 82(6): 951-961.
[8] Chen S, Luo H, Li Y, et al. 454 EST analysis detects genes putatively involved in ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Rep*, 2011, 30(9): 1593-1601.
[9] He L, Xu X L, Li Y, et al. Transcriptome analysis of buds and leaves using 454 pyrosequencing to discover genes associated with the biosynthesis of active ingredients in *Lonicera japonica* Thunb [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62922.
[10] Liu X B, Ma L, Zhang A H, et al. High-throughput analysis and characterization of *Astragalus membranaceus* transcriptome using 454 GSFLX [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e95831.
[11] Grabherr M G, Haas B J, Yassour M, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 644-652.
[12] 李静, 李娟, 贾金萍, 等. 基于UHPLC-QE Extractive轨道阱高分辨质谱的款冬花、叶的化学比较[J]. 药学报, 2018, 53(3): 444-452.
[13] 林懋怡, 牛卉, 刘晋杰, 等. 基于转录组分析华细辛甲基丁香酚生物合成途径的相关基因[J]. 中草药, 2017, 48(15): 3160-3167.