

杜仲愈伤组织转录组分析及其类黄酮合成相关基因的 qRT-PCR 分析

张俊娥¹, 邓华锋²

1. 江西师范大学生命科学学院, 江西 南昌 330022

2. 江西师范大学计算机信息工程学院, 江西 南昌 330022

摘要: **目的** 分析光、暗培养的杜仲愈伤组织转录组测序结果, 验证杜仲愈伤组织转录组测序结果中与类黄酮合成相关基因的表达水平。 **方法** 利用 Illumina HiSeqTM 2500 测序平台对光暗培养的 2 种杜仲愈伤组织进行转录组高通量测序, 利用 Trinity 软件对测序结果进行 *De novo* 组装, 使用 BLAST 软件将 Unigenes 序列与 NR、Swiss-Prot、GO、COG、KOG、KEGG、Pfam 等数据库比对, 利用 FPKM 值估算基因表达丰度, 利用 qRT-PCR 验证与类黄酮合成相关基因的表达水平。 **结果** 杜仲愈伤组织转录组测序共获得 13.00 Gbp 的 clean data。 *De novo* 组装后共获得 62 030 条 Unigenes, 平均长度为 736.40 bp。使用 BLAST 软件将 Unigenes 序列与相关数据库比对, 共获得 25 417 条 Unigenes 的注释结果。其中, 25 167 条 Unigenes 注释到 Nr。4 794 条 Unigenes 和它们相关的酶 (enzyme commission numbers) 注释到 82 条 KEGG 通路。共获得差异表达基因 1 986 条。在白光 (光强为 12 000 lx, 16 h 光照, 8 h 黑暗) 培养的愈伤组织中, 有 1 139 条基因表达上调, 847 条基因表达下调。在 KEGG 富集分析中发现, 有 7 个 Unigenes 与类黄酮合成相关, 其中有 6 个 Unigenes 在白光培养的杜仲愈伤组织中上调表达, 它们编码的酶分别为查耳酮异构酶 (EC 5.5.1.6, chalcone isomerase, CHI), 查耳酮合成酶 (EC 2.3.1.74, chalcone synthase, CHS), 类黄酮 3'-羟化酶 (EC 1.14.13.21, flavonoid 3'-monooxygenase, F3'H), 反肉桂酸 4-单加氧酶 (EC 1.14.13.11, *trans*-cinnamate 4-monooxygenase, CYP), 黄酮醇合成酶 (EC 1.14.11.23, flavonol synthase, FLS), 莽草酸邻羟基肉桂转移酶 (EC 2.3.1.133, shikimate-O-hydroxycinnamoyl transferase, HQT)。1 个 Unigene 下调表达, 它编码的酶为无色花青素加氧酶 (EC 1.14.11.19, leucocyanidin oxygenase, LDOX)。qRT-PCR 分析表明, 与类黄酮合成相关的 7 个 Unigenes 的表达情况与转录组测序分析结果是一致的。 **结论** 白光条件 (光强为 12 000 lx, 16 h 光照, 8 h 黑暗) 可以促进类黄酮代谢途径中相关化合物的积累。

关键词: 杜仲; 愈伤组织; 转录组高通量测序; 类黄酮生物合成; 实时定量 PCR

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)16-3912-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.16.027

Analysis of transcriptome sequencing and qRT-PCR analysis of related genes of flavonoid biosynthesis from *Eucommia ulmoides* calli

ZHANG Jun-e¹, DENG Hua-feng²

1. School of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China

2. School of Computer and Information Engineering, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China

Abstract: **Objective** To analyse the transcriptome sequencing results of *Eucommia ulmoides* calli under light and dark culture condition, and verify the expression level of the related genes of flavonoid biosynthesis from transcriptome sequencing results. **Methods** The transcriptome high-throughput sequencing of *E. ulmoides* calli was performed by using the Illumina HiSeqTM 2500 sequencing platform, and *de novo* assembly of the transcriptome sequencing results was finished by Trinity software. The sequencing results of Unigenes were compared with the databases of NR, Swiss-Prot, GO, COG, KOG, KEGG and Pfam by BLAST software. The gene expression abundance was estimated by FPKM value. qRT-PCR was used to verify the expression level of the related genes of flavonoid biosynthesis. **Results** About 13.00 Giga base pairs (Gbp) clean data (more than 6.02 Gbp, respectively) were obtained, and *de novo* assembly generated 62 030 Unigenes with an average length of 736.40 bp. A total of 25 167 Unigenes were annotated to Nr. Totally 4 794 Unigenes and their associated enzymes (enzyme commission numbers) were annotated to 82 KEGG pathway. There

收稿日期: 2018-02-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31100396); 江西省科技厅自然科学基金面上项目 (20171BAB204004); 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ150332)

作者简介: 张俊娥 (1972—), 女, 山西榆社人, 博士, 副教授, 研究方向为从事中药材生物技术与遗传育种。E-mail: zhangjune2001@aliyun.com

were 1 986 genes identified as significantly and differentially expressed genes between the two calli under light and dark culture. Among them, 1 139 (57.35%) were up-regulated and 847 (42.65%) were down-regulated in the calli under light culture. Metabolic pathway analysis revealed that seven Unigenes were predicted to be responsible for the flavonoid biosynthesis, six Unigenes of which were up-regulated in the calli under light culture, encoding chalcone isomerase (EC 5.5.1.6), chalcone synthase (EC 2.3.1.74), flavonoid 3'-monooxygenase (EC 1.14.13.21), *trans*-cinnamate 4-monooxygenase (EC 1.14.13.11), Flavonol synthase (EC 1.14.11.23), shikimate-*O*-hydroxycinnamoyl transferase (EC 2.3.1.133). One Unigene was down-regulated in the calli under light culture, which encoded leucocyanidin oxygenase (EC 1.14.11.19). qRT-PCR analysis showed that the expression of the seven genes related with flavonoid biosynthesis was coincident with the transcriptome high-throughput sequencing results. **Conclusion** The white light (12 000 lx, 16 h light and 8 h dark) could improve the production capacity of some metabolic intermediate of flavonoid biosynthesis pathway of *E. ulmoides* calli.

Key words: *Eucommia ulmoides* Oliv.; callus; transcriptome high-throughput sequencing; flavonoid biosynthesis; qRT-PCR

杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 是我国第三纪古老孑遗植物, 也是我国特有单属科、单种属珍稀植物。是一种以药用为主并具有多种用途树种, 具有很高的药用价值和营养保健功效^[1-2]。杜仲的果实、叶片、树皮、雄蕊等组织和器官中含有丰富的类黄酮活性成分。类黄酮是植物中重要的一类多酚类次生代谢产物, 具有调血脂、降血糖、防止血管硬化、抗衰老、增强机体免疫力、防癌抗癌等功效^[3], 还可以做功能食品的添加剂、天然抗氧化剂、天然色素和天然甜味剂等。在医药和食品等领域具有广阔的应用前景^[4-5]。因此, 获取高含量的类黄酮作物品种意义重大。发掘和利用类黄酮相关基因资源, 探明类黄酮次生代谢物积累的分子机制, 对培育植物特异种质资源和植物分子育种具有重要意义。

目前, 由于新药开发以及功效的确认, 市场对杜仲的有效活性成分的需求量极大, 但我国土地资源有限并且生态环境因过度开采遭到严重的破坏, 野生杜仲资源数量急剧减少^[6-7]。合理的保护和利用现有的杜仲野生资源迫在眉睫。本实验以杜仲愈伤组织为研究材料, 进行转录组高通量测序, 对测序结果进行 KEGG 通路分析, 选择类黄酮合成相关的酶基因进行表达验证, 为揭示类黄酮合成相关酶基因作用机制奠定基础。为获取高含量的类黄酮资源和杜仲遗传分析提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料 样品由江西省林业科学院朱培林研究员鉴定为杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 种子。取杜仲幼苗嫩叶为外植体诱导愈伤组织。杜仲愈伤组织培养及其 RNA 提取材料的准备参照张俊娥等^[8]的方法。

1.1.2 试剂 RN40-EASYspin 植物 microRNA 快速提取试剂盒, 购自北京艾德莱生物科技有限公司; NEB 试剂盒, 购自纽英伦生物技术(北京)有限公司; qRT-PCR 试剂盒, 购自北京百奥莱博科技有限公司; 其余试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

将冻存的光、暗培养条件下的杜仲愈伤组织送至北京百迈客生物科技有限公司进行测序和分析。类黄酮含量测定参照张志斌等^[9]的方法, RNA 提取、cDNA 文库构建、测序和分析方法参照张俊娥等^[10]的方法。从测序结果分析的 KEGG 通路中筛选出与类黄酮合成相关的 7 个酶基因进行 qRT-PCR 分析。qRT-PCR 反应体系参照张俊娥等^[8]的方法。

2 结果与分析

2.1 杜仲愈伤组织中类黄酮含量变化分析

对光、暗培养条件下培养 5、10、15、20、25 d 的杜仲愈伤组织中类黄酮含量进行测定和分析, 结果表明, 在白光(光强 12 000 lx, 光照 16 h, 黑暗 8 h)条件下不同培养时间培养的杜仲愈伤组织中类黄酮含量均比黑暗条件下培养的杜仲愈伤组织中类黄酮含量高, 如图 1 所示。培养 20 d 时, 两种条件下培养的杜仲愈伤组织中类黄酮含量均达到最大, 白光条件下类黄酮质量分数达到 14.21 mg/g, 比黑暗条件下类黄酮含量高。可见, 白光(光强 12 000 lx, 光照 16 h, 黑暗 8 h)促进杜仲愈伤组织中类黄酮的积累。随后, 选取光、暗条件培养 20 d 左右的杜仲愈伤组织进行转录组测序和分析, 为探知在杜仲愈伤组织中与类黄酮合成相关的基因表达情况。

2.2 杜仲愈伤组织 Unigenes 同源性比对分析

杜仲愈伤组织转录组测序共获得 13.00 Gbp 的 clean data。De novo 组装后共获得 62 030 条 Unigenes, 平均长度为 736.40 bp。使用 BLAST 软

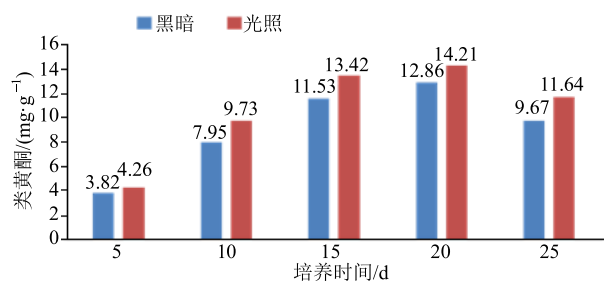


图 1 光、暗培养的杜仲愈伤组织中类黄酮的含量变化

Fig. 1 Content changes of flavonoids in *E. ulmoides* calli under light and dark culture

件将 Unigenes 序列与相关数据库比对,共获得 25 417 条 Unigenes 的注释结果。使用 BLAST 软件将组装获得的 62 030 条 Unigenes 序列与 Nr 数据库 (Non-redundant Protein Database) 比对,25 167 条 Unigenes 注释到 Nr。分析表明,杜仲与葡萄 *Vitis vinifera* L. 匹配比例最高,为 8 775 条,占到可匹配序列的 34.87%,其次分别为番茄 *Solanum lycopersicum* L. (13.30%)、可可 *Theobroma cacao* L. (10.84%)、桃 *Prunus persica* (L.) Batsch (6.33%)、杨树 *Populus trichocarpa* L. (5.30%)、蓖麻 *Ricinus communis* L. (4.70%)、野草莓 *Fragaria vesca* L. (2.34%)、黄瓜 *Cucumis sativus* L. (2.07%)、大豆 *Glycine max* (L.) Merr. (2.06%)、苜蓿 *Medicago truncatula* Gaertn. (1.18%) (图 2)。

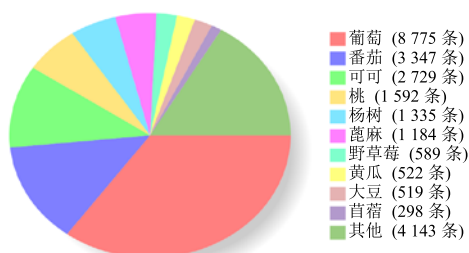


图 2 杜仲愈伤组织与 Nr 数据库比对结果

Fig. 2 Characteristics of homology search of Unigene library of *E. ulmoides* calli against Nr database

2.3 杜仲愈伤组织 Unigenes 的 KEGG 分类

为了进一步研究杜仲愈伤组织中基因的相互作用和生物学功能,使用 BLAST 软件将组装获得的 62 030 条 Unigene 序列与 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 数据库比对,4 794 条 Unigene 和它们相关的酶 (enzyme commission numbers) 注释到 82 条 KEGG 通路。在光、暗培养的 2 种愈伤组织中共获得差异表达基

因 1 986 条 Unigenes。分析表明,杜仲愈伤组织中差异表达的 Unigenes 主要集中在注释到“次生代谢产物的生物合成”通路。其中,15 条 Unigenes 注释到“苯丙素的生物合成”通路,12 条 Unigenes 注释到“苯丙氨酸代谢”通路,11 条 Unigenes 注释到“萜类化合物骨架生物合成”途径,9 条 Unigenes 注释到“类胡萝卜素的生物合成”途径,7 条 Unigenes 注释到“类黄酮的生物合成”途径 (图 3)。

2.4 杜仲愈伤组织 Unigenes 的差异表达分析

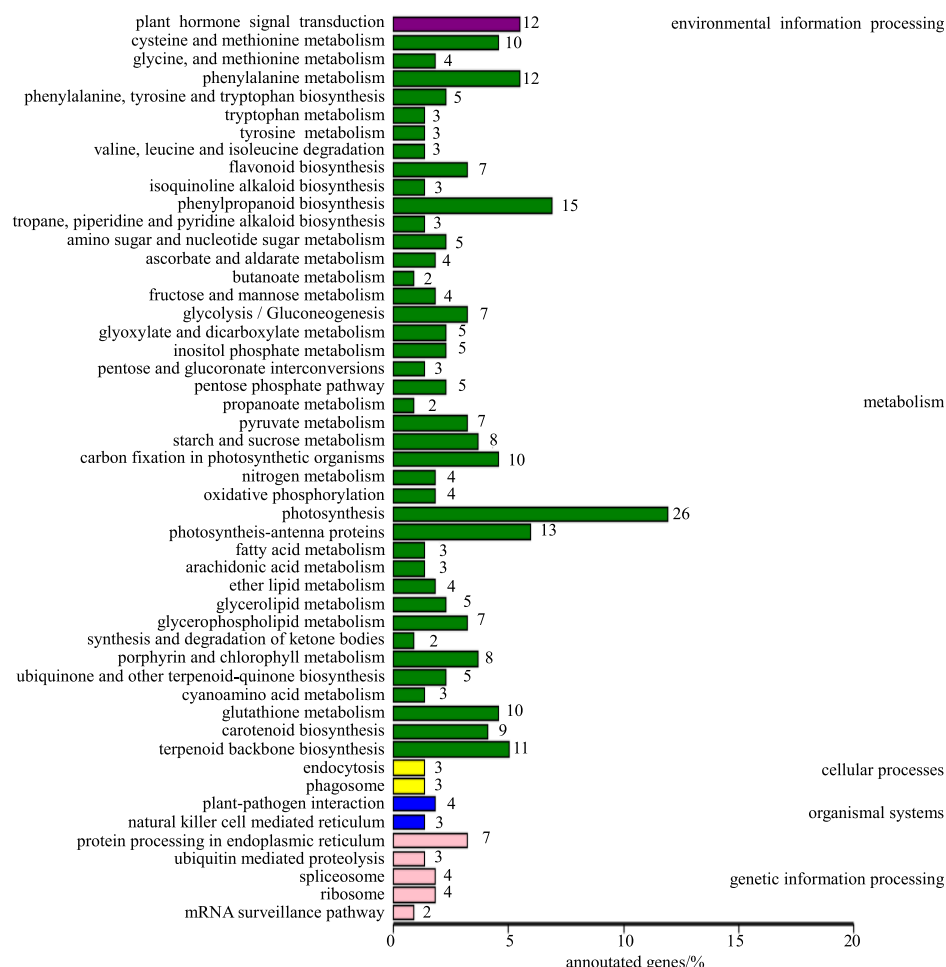
采用 EBSec^[11]软件进行杜仲愈伤组织基因差异表达分析,获得 2 个样品,即白光条件下培养的杜仲愈伤组织 (T2) 和黑暗条件下培养的杜仲愈伤组织 (T1) 之间的差异表达基因集。结果表明,共获得差异表达基因 1 986 个,其中在白光 (光强 12 000 lx,光照 16 h,黑暗 8 h) 条件下上调表达的基因有 1 139 个,下调表达的基因 847 个。

2.5 杜仲愈伤组织 Unigenes 的类黄酮合成相关基因的分析

对杜仲愈伤组织转录组 Unigenes 的功能注释结果进行分析,结果表明,7 条 Unigenes 与类黄酮生物合成相关,其中在白光 (光强 12 000 lx,光照 16 h,黑暗 8 h) 条件下,6 条 Unigenes 上调表达,分别为 c32471.graph_c0、c34075.graph_c0、c43765.graph_c0、c44837.graph_c0、c47312.graph_c0、c58967.graph_c0,它们编码的酶分别为查耳酮异构酶 (EC 5.5.1.6, chalcone isomerase, CHI)、查耳酮合成酶 (EC 2.3.1.74, chalcone synthase, CHS)、类黄酮 3'-羟化酶 (EC 1.14.13.21, flavonoid 3'-monooxygenase, F3'H)、反肉桂酸 4-单加氧酶 (EC 1.14.13.11, *trans*-cinnamate 4-monooxygenase, CYP)、黄酮醇合成酶 (EC 1.14.11.23, flavonol synthase, FLS)、莽草酸邻羟基肉桂转移酶 (EC 2.3.1.133, shikimate-*O*-hydroxycinnamoyl transferase, HQT)。另外 1 条 Unigenes 下调表达,该 Unigene 为 c52030.graph_c0,它编码的酶为无色花青素加氧酶 (EC 1.14.11.19, leucocyanidin oxygenase, LDOX)。在类黄酮代谢途径中,CHI 和 CHS 是关键酶。由分析结果推断出,白光条件下,类黄酮生物合成途径中代谢中间产物生产能力将提高。

2.6 qRT-PCR 分析

利用 FPKM (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads) 值^[12]估算基因表达丰度,



纵坐标为 KEGG 代谢通路的名称，横坐标为注释到该通路下的基因个数及其个数占被注释上的基因总数的比例
 Ordinate represents name of metabolic pathway for KEGG, and abscissa represents gene number and e ratio of genes annotated to pathway

图 3 杜仲愈伤组织差异表达 Unigene 基因 KEGG 分类图
 Fig. 3 KEGG classification of Unigene library of *E. ulmoides* calli

测序结果 FPKM 如表 1 所示。为验证测序结果的准确性，对类黄酮合成相关的 7 个酶基因进行 qRT-PCR 验证。利用 Primer Premier 5.0 设计引物（表 2），EuAction 作为内参基因。在光暗培养的杜仲愈伤组织中扩增该 7 个基因和 EuAction，扩增产物好，扩增长度为 81~137 bp（表 2），部分扩增的胶图见图 4，这些引物可以为后续研究所用。随后进行 qRT-PCR 表达分析，结果表明，7 个与类黄酮合成相关的基因在白光条件下上调或下调变化的倍数与测序结果有些差异，但是 qRT-PCR 结果中基因上调或下调的趋势与测序结果一致，即 6 个基因（c32471.graph_c0、c34075.graph_c0、c43765.graph_c0、c44837.graph_c0、c47312.graph_c0、c58967.graph_c0）上调表达，1 个基因（c52030.graph_c0）下调表达。qRT-PCR 分析结果见图 5。

表 1 杜仲愈伤组织转录组高通量测序中与类黄酮合成相关的 7 个 Unigenes 的表达量 FPKM 分析

Table 1 FPKM results of seven Unigenes involved in flavonoid biosynthesis in *E. ulmoides* calli from transcriptome high-throughput sequencing

基因名称	Z01 (FPKM)	Z02 (FPKM)
c32471.graph_c0	4.40	50.0
c34075.graph_c0	5.10	10.7
c43765.graph_c0	5.70	14.5
c44837.graph_c0	100.00	211.0
c47312.graph_c0	4.90	11.2
c52030.graph_c0	3.96	0.87
c58967.graph_c0	30.40	66.8

Z01 代表黑暗条件下的愈伤组织；Z02 代表强光条件下的愈伤组织
 Z01 represented callus under dark culture; Z02 represented callus under light culture

表 2 杜仲愈伤组织中与类黄酮合成相关的 7 个基因的 qRT-PCR 引物

Table 2 Primers for qRT-PCR to verify seven genes involved in flavonoid biosynthesis in <i>E. ulmoides</i> calli			
基因	引物序列 (5'→3')		扩增长度/bp
c32471.graph_c0	F	TATTTTCATTCTTAGTAGTCTTATCGG	128
	R	TGTCAGAGGCTTTTGCTTG	
c34075.graph_c0	F	CTGGATGAGATGAGAAAGAAG	84
	R	AAACCCGAAGAGAACACC	
c43765.graph_c0	F	ATGTTGATGGGGAAGGAG	132
	R	TTGGATGGCGGATTAGTT	
c44837.graph_c0	F	AACTATGGCGATTTTATTCC	81
	R	CCTTCTCTCTTTCACCTCCTT	
c47312.graph_c0	F	GGGGTGTGTTGAAGGAAG	137
	R	AAGAATGGTGATGGCTGA	
c52030.graph_c0	F	GGGTAAGCCAAGTGAAAA	129
	R	GGTGGAGGAGAAGGAGAA	
c58967.graph_c0	F	GCTTCTACTAACCGATTGGAC	112
	R	ATGTTTTGCCCGTGATTT	
EuAction	F	CCAATCGTGAGAAAATGACT	91
	R	GCGTAAAGCGAGAGAACC	

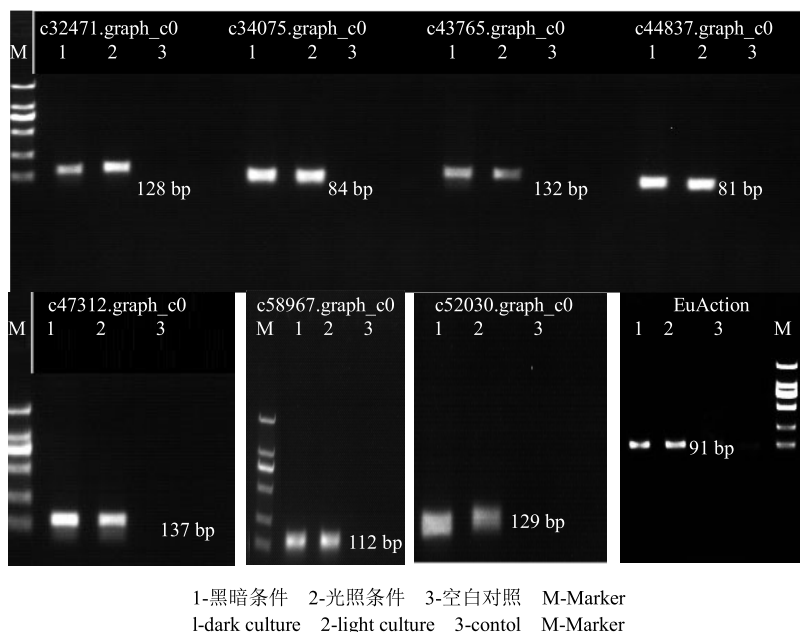


图 4 类黄酮合成相关酶基因和内参基因 EuAction 的电泳图

Fig. 4 Electrophoregram of related enzyme genes of flavonoid biosynthesis using EuAction as reference gene

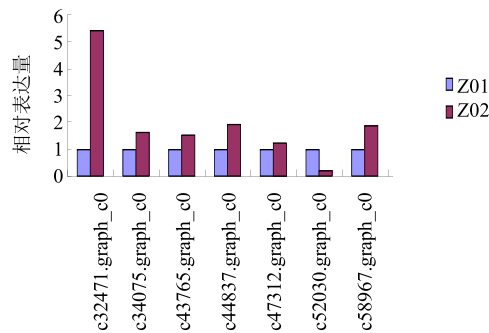
3 讨论

对于杜仲转录组研究方面,李铁柱等^[13-14]、赵德刚等^[15]、Feng 等^[16]通过对杜仲的幼果和成熟果、果实和叶片、雌雄株、种子等组织和器官进行了转录组测序研究,为杜仲转录组研究奠定基础。到目前为止,尚未见对杜仲的其他组织或器官进行转录组高通量测序分析及其相关基因更深入的研究。李铁柱等^[17]进行了杜仲黄酮生物合成途径相关基因表达差异分析,对杜仲果实和叶片转录组测序结果进行了分析总结,但他们尚未对相关基因表达进行 qRT-PCR 分析验证。

由于分子生物学在中药领域起步较晚,中药的分子生物学研究基础薄弱^[18]。在药用植物中,黄酮

类化合物代谢合成途径及相关基因的研究处于起步阶段^[19],并且黄酮生物合成的关键酶具有遗传多样性,并且基因表达比较复杂^[17],到目前为止,对杜仲类黄酮生物合成途径分子机制的研究尚未见报道。由于愈伤组织的生长环境便于人为操作,灵活可控。所以,本项目选取杜仲愈伤组织为研究材料进行转录组高通量测序,然后基于转录组测序结果对杜仲愈伤组织中类黄酮化合物合成相关基因进行基因表达分析,为最终高通量发掘杜仲中新型活性成分奠定基础。

本实验对光、暗培养的杜仲愈伤组织进行了转录组高通量测序和功能注释。利用生物信息学软件对测序结果进行了进行 GO (gene ontology) 富集、



Z01-黑暗条件下培养的杜仲愈伤组织 Z02-白光条件下培养的杜仲愈伤组织

Z01-represented callus under dark culture Z02-represented callus under white light culture.

图 5 在光暗培养的 2 种杜仲愈伤组织中 7 种 Unigenes 的基因差异表达的 qRT-PCR 分析

Fig. 5 Difference in gene expression profiles of two *E. ulmoides* calli by qRT-PCR analysis under light and dark culture

COG (clusters of orthologous groups of protein) 分类、KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 注释及通路富集等分析。对 KEGG 通路分析得到, 白光 (光强 12 000 lx, 光照 16 h, 黑暗 8 h) 培养的杜仲愈伤组织中与类黄酮合成相关的 6 个酶基因 c32471.graph_c0、c34075.graph_c0、c43765.graph_c0、c44837.graph_c0、c47312.graph_c0、c58967.graph_c0 上调表达, 意味着白光 (光强 12 000 lx, 光照 16 h, 黑暗 8 h) 促进杜仲愈伤组织中类黄酮的积累。对杜仲愈伤组织总黄酮含量测定分析也表明, 白光有促进杜仲愈伤组织类黄酮的积累。但是, 这些相关基因受白光影响促进杜仲愈伤组织的类黄酮积累的机制尚不清楚。本研究下一步工作将深入研究这些与类黄酮合成相关的基因上调表达促进类黄酮积累的调控机制。

参考文献

- [1] 张康健, 马希汉. 杜仲次生代谢物与人类健康 [M]. 杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2009.
- [2] He X R, Wang J H, Li M X, *et al.* *Eucommia ulmoides* Oliv.: Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine [J]. *J Ethnopharm*, 2014, 151(1): 78-92.
- [3] Williams R J, Spencer J P E, Rice-Evans C. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules [J]. *Free Rad Biol Med*, 2004, 36(7): 838-849.
- [4] 沈忠伟, 许昱, 夏犇, 等. 植物类黄酮次生代谢生

物合成相关转录因子及其在基因工程中的应用 [J]. 分子植物育种, 2008, 6(3): 542-548.

- [5] 邢文, 金晓玲. 调控植物类黄酮生物合成的 MYB 转录组因子的研究进展 [J]. 分子植物育种, 2015, 3(3): 689-696.
- [6] Yao X H, Deng J Y, Huang H W. Genetic diversity in *Eucommia ulmoides* (Eucommiaceae), an endangered traditional Chinese medicinal plant [J]. *Conservation Genetics*, 2012, 13(6): 1499-1507.
- [7] Zhang W R, Li Y, Zhao J, *et al.* Isolation and characterization of microsatellite markers for *Eucommia ulmoides* (Eucommiaceae), an endangered tree, using next-generation sequencing [J]. *Genet Mol Res Gmr*, 2016, 15(2): 1-5.
- [8] 张俊娥, 郑文强. 杜仲愈伤组织中类胡萝卜素合成相关基因的表达分析 [J]. 分子植物育种, 2017, 15(1): 107-112.
- [9] 张志斌, 颜日明, 邱晓芳, 等. 杜仲愈伤组织与悬浮细胞中黄酮和绿原酸积累研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(13): 1636-1639.
- [10] 张俊娥, 邓华锋, 郑文强, 等. 基于转录组高通量测序分析白光对杜仲愈伤组织中绿原酸含量的影响 [J]. 江西师范大学学报: 自然科学版, 2015, 39(6): 570-574.
- [11] Leng N, Dawson J A, Thomson J A, *et al.* EBSeq: An empirical Bayes hierarchical model for inference in RNA-seq experiments [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(8): 1035-1043.
- [12] Trapnell C, Williams B A, Pertea G, *et al.* Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(5): 511-515.
- [13] 李铁柱, 杜红岩, 刘慧敏, 等. 杜仲果实和叶片转录组数据组装及基因功能注释 [J]. 中南林业科技大学学报, 2012, 32(11): 122-130.
- [14] 李铁柱, 杜红岩, 刘慧敏, 等. 杜仲幼果和成熟果实转录组数据组装及基因功能注 [J]. 中南林业科技大学学报, 2012, 32(10): 9-17.
- [15] 赵德刚, 李岩, 赵懿琛, 等. 杜仲雌雄株转录组测序数据组装及基因功能注释 [J]. 山地农业生物学报, 2015, 34(1): 1-12.
- [16] Feng Y Z, Wang L, Fu J M, *et al.* Transcriptome sequencing discovers genes related to fatty acid biosynthesis in the seeds of *Eucommia ulmoides* [J]. *Genes Genom*, 2016, 38(3): 275-283.
- [17] 李铁柱, 杜红岩, 王璐. 杜仲黄酮生物合成途径相关基因表达差异研究 [J]. 经济林研究, 2014, 32(1): 21-26.
- [18] 邢朝斌, 张妍彤, 王卓, 等. DNA 甲基化及重亚硫酸盐测序法在药用植物中的应用策略 [J]. 中草药, 2017, 48(24): 5063-5069.
- [19] 康亚兰, 裴瑾, 蔡文龙, 等. 药用植物黄酮类化合物代谢合成途径及相关功能基因的研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(9): 1336-1341.