

基于转录组测序的银杏类黄酮生物合成关键基因表达分析

刘伟^{1,2}, 王俊焱¹, 李萌¹, 董金金², 何崇单², 汪贵斌³, 郁万文³, 王义强^{1,2*}

1. 中南林业科技大学 经济林培育与保护教育部重点实验室, 湖南 长沙 410004

2. 中南林业科技大学 林业生物技术湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410004

3. 南京林业大学林学院, 江苏 南京 210037

摘要: 目的 对银杏进行转录组测序, 分析银杏生长发育不同时期类黄酮生物合成关键基因的表达。方法 以银杏幼年树和成年树不同时期叶片作为供试材料, 利用 Illumina HiSeq 2000 进行转录组测序, 对 Unigene 进行功能注释, 分析银杏类黄酮生物合成关键基因的表达特征。结果 转录组测序共获得 43 073 条 Unigene, 其中 35 179 条被注释, 基因差异表达 (DEG) 筛选得到 5 117 个基因。通过对类黄酮合成相关 KEGG 途径进行分析, 筛选出 50 条候选基因。分析 50 条候选基因的表达规律, 发现类黄酮合成关键基因均在银杏幼叶中高表达, 但在成年树与幼年树同时期叶片之间表达差异不显著。分析与类黄酮合成关系密切的 13 个基因发现, 其中肉桂酸 4-羟化酶 (C4H)、查耳酮合成酶 (CHS)、花青素合成酶 (ANS)、花青素还原酶 (ANR) 和类黄酮 O-甲基转移酶 (FOMT) 基因的表达量较高, 类黄酮 3'-羟化酶 (F3'H)、类黄酮 3',5'-羟化酶 (F3'5'H) 和黄酮醇合成酶 (FLS) 基因的表达量则相对较低。结论 通过转录组高通量测序, 筛选分析了银杏类黄酮生物合成的关键基因及其表达特征, 为提高银杏类黄酮产量提供了分子生药学理论基础。

关键词: 银杏; 转录组; 类黄酮; 黄酮醇; Illumina HiSeq 2000

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)23-5633-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.23.024

Transcriptome sequencing analysis of gene expression of flavonoid biosynthesis in *Ginkgo biloba*

LIU Wei^{1,2}, WANG Jun-yi¹, LI Meng¹, DONG Jin-jin², HE Chong-dan², Wang Gui-bin³, Yu Wan-wen³, WANG Yi-qiang^{1,2}

1. Key Laboratory of Non-wood Forest Nurturing and Protection of National Ministry of Education, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China

2. Hunan Provincial Key Laboratory for Forestry Biotechnology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China

3. College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China

Abstract: Objective The transcriptome sequencing was used to analyze the expression of key genes of flavonoid biosynthesis in different stages of growth and development of *Ginkgo biloba*. **Methods** The leaves of young trees and adult trees of *G. biloba* in different periods were used as the test material. Transcriptome sequencing analysis was carried out by using Illumina HiSeq 2000, and analyses of gene functional annotation of Unigene and expression characteristics of key genes for biosynthesis of *G. biloba* flavonoids were also performed. **Results** A total of 43 073 Unigene were obtained by transcriptome sequencing, of which 35 179 were annotated and 5 117 genes were screened by differential gene expression. Fifty candidate genes were screened by analyzing KEGG pathway related to flavonoid synthesis. The expression patterns of 50 candidate genes were analyzed. It was found that the key genes of flavonoid synthesis were all highly expressed in young leaves of *G. biloba*, but there was no significant difference in the leaves between adult and young trees at same time. The 13 genes closely related to the synthesis of flavonoids were analyzed. Among them, the expression of C4H, CHS, ANS, ANR, and FOMT genes was high, and the expression of F3'H, F3'5'H, and FLS genes was relatively low. **Conclusion** Through transcriptome sequencing, we screened and analyzed the key genes of flavonoid biosynthesis of *G. biloba* and their expression characteristics, which provided the theoretical basis of molecular pharmacology for improving the yield of ginkgo flavonoids.

Key words: *Ginkgo biloba* L.; transcriptome; flavonoids; flavonols; Illumina HiSeq 2000

银杏 *Ginkgo biloba* L. 又名公孙树、鸭脚子, 系我国特产^[1]。银杏是现存的最古老的树种, 中生代单科单属裸子植物, 世界著名孑遗物种、长寿树种, 代曾广泛分布于北半球, 现仅在我国浙江天目山地

收稿日期: 2018-04-06

基金项目: “十三五”国家重点研发计划专项 (2017YFD0600701); 国家自然科学基金项目 (31570682)

作者简介: 刘伟 (1993—), 男, 硕士研究生, 研究方向为药用植物开发利用。E-mail: liuwei4272@126.com

*通信作者 王义强, 男, 博士生导师, 教授, 主要从事药用植物生物技术研究。E-mail: wangyiqiang12@163.com

区有野生植株,素有“植物界的活化石”之称。银杏为我国传统中药,在元代《日用本草》、明代《本草品汇精要》及清代《本草逢源》等多种本草药集中均有记述^[2]。

1965 年,德国 Schwabe 药厂将银杏叶提取物(EGb761)引入临床医疗从而使银杏进入世界研究者的视野,随后大量研究发现^[3],EGb761 具有广泛的药用功能。EGb761 主要药用成分为类黄酮(24%)和萜内酯(6%)。银杏类黄酮在改善脑功能、促进血液循环、调节免疫系统、清除自由基、抗氧化、抗衰老等方面都有显著效果^[4-7],常用于预防和治疗老年痴呆、卒中、脑梗死等老年常见病^[8-9]。以银杏叶提取物(EGb)制备的药剂已在欧洲、亚洲临床医学上广泛应用,而如何提高作为 EGb 主要成分的黄酮物质的含量,已成为迫切需要解决的问题。

迄今,在模式植物中与类黄酮生物合成相关的功能基因均已被克隆并进行了广泛地研究,从而使类黄酮生物合成途径成为植物中研究得最为深入的次生代谢途径^[10-12]。但在银杏中类黄酮主要以其提取工艺、药用价值、药理作用研究居多,生物合成分子机制研究相对较少^[13-14]。目前,提高银杏类黄酮产量的方法主要以激素调控、前体物质添加、培养条件优化等为主^[15-16]。2016 年 11 月银杏基因组测序完成,为银杏转录组测序提供了参考基因组,有利于从分子生物学水平深入研究银杏次生代谢物生物合成的调控机制。本研究通过转录组测序分析类黄酮生物合成途径的关键基因及其表达模式,以期在分子水平寻找提高银杏类黄酮产量的方法,为将来利用基因工程技术改造银杏基因组,培育高产、高品质银杏叶品种奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

植株种植于中南林业科技大学,经中南林业科技大学王义强教授鉴定为银杏科银杏属植物银杏 *Ginkgo biloba* L.。分别在 4 月(幼叶期)、9 月(成熟叶期)采集银杏幼年树(10 年生)、成年树(30 年生)3 个单株树冠叶片,将叶片材料制成混合样品。样品标记为 T1~T4,液氮速冻后保存于-80 °C 备用。

1.2 转录组测序与分析

1.2.1 总 RNA 的提取与文库构建 使用 E. Z. N. A. Plant RNA Kit (Omega, R6827-01) 提取样品总

RNA。将检测满足测序要求的总 RNA 进行文库构建。用带有 Oligo(dT)的磁珠富集真核生物 mRNA,加入 Fragmentation Buffer 将 mRNA 进行随机打断,以 mRNA 为模板用六碱基随机引物(random hexamers)合成第 1 条 cDNA 链,再合成第 2 条 cDNA 链,经过纯化的双链 cDNA 再进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头,最后通过 PCR 富集得到 cDNA 文库。

1.2.2 转录组测序及与参考基因组比对 转录组高通量测序委托北京百迈客生物科技有限公司完成。使用 Illumina HiSeq 2000 测序平台对 cDNA 文库进行测序得到大量 raw reads,过滤后得到 clean data,与银杏基因组进行序列比对,得到的 mapped data,进行插入片段长度检验、随机性检验等文库质量评估。

1.2.3 基因功能分析与差异表达基因筛选 将得到的全部 Unigene 与 Nr(NCBI non-redundant protein sequences)数据库比对,以 E 值 $< 1 \times 10^{-5}$ 为阈值,利用 BLAST 算法进行基因功能注释。同时,将 Unigene 分别与 GO、COG、KEGG、Swiss-Prot、Pfam 数据库比对,分析预测基因的功能分类和参与的生物学途径。

利用 EBseq 平台分析差异表达基因(differentially expressed genes, DEG),使用 FPKM (fragments per kilobase of transcript per million fragments mapped)法^[17]计算基因的表达量,作为衡量转录本表达水平的指标,使用 FDR (false discovery rate)进行可信度检验。在差异表达基因检测过程中,将差异倍数(fold change) ≥ 2 且 $FDR < 0.01$ 作为筛选标准。根据基因在不同样品中的表达量进行差异表达分析、差异表达基因功能注释和功能富集等表达水平分析。

2 结果与分析

2.1 银杏转录组测序分析

2.1.1 测序数据质量分析 通过 Illumina HiSeq 2000 测序平台获得 raw reads 后,通过过滤去除低质量片段,参照银杏基因组拼接组装,各样品数据统计如表 1 所示。各样品 clean data 均达到 7 Gb 以上,碱基质量超过 Q30 的比例均在 90%以上,且 GC 含量均在 50%左右,说明测序组装效果好,符合后续分析要求。分别将各样品的 clean reads 与银杏参考基因组进行序列比对,比对效率均达 75%左右,说明测序精度高。

表 1 转录组测序数据质量分析

Table 1 Quality analysis of transcriptome sequencing data

编号	样品	raw reads 数	clean reads 数	clean bases 数	GC/%	超过 Q30/%	与参考基因组比对率/%
T1	4 月成年树叶	24 450 334	24 032 233	7 133 310 676	46.28	90.57	81.44
T2	9 月成年树叶	29 918 870	29 383 322	8 727 128 292	45.63	90.82	74.62
T3	4 月幼年树叶	30 370 247	29 759 805	8 833 572 320	46.95	90.50	73.16
T4	9 月幼年树叶	25 066 612	24 663 040	7 336 747 596	45.72	90.13	75.34

2.1.2 测序数据注释信息分析 组装拼接后共得到 43 073 条 Unigene, 使用 BLAST 软件将 Unigene 与常用的各大数据库进行比对分析, 获得注释的 Unigene 共 35 179 条。从表 2 可以看出, 在 COG、GO、KEGG 数据库中注释的 Unigene 数都在 20 000 条以下, 其他数据库的注释数则都超过 20 000 条, 在 eggNOG 和 Nr 数据库中的注释数甚至达 30 000 条以上。同时长度大于 1 000 bp 的 Unigene 有 18 517 条, 约占注释 Unigene 总数的 52.6%。

表 2 Unigene 在各数据库的注释分布

Table 2 Unigene annotations in each database

注释数据库	注释数目	300 bp ≤ 长度 < 1 000 bp	长度 ≥ 1 000 bp
COG	11 898	4 259	7 346
GO	19 196	8 291	10 003
KEGG	12 190	5 243	6 399
KOG	20 397	8 166	11 463
Pfam	27 275	10 248	16 389
Swiss-Prot	24 086	9 202	14 044
eggNOG	33 685	14 160	18 200
Nr	34 804	14 896	18 440
总计	35 179	15 157	18 517

Unigene 与 Nr 数据库进行 BLAST 比对发现, 银杏转录组测序得到的 Unigene 与北美云杉 *Picea sitchensis* (Bong.) Carr. 的 Unigene 相似数最多, 达到了 31.14% (图 1)。其次是无油樟 *Amborella trichopoda* L. 和莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. Fruct. et Semin. Pl.。其他几个物种相似数量较少, 约占 2%~5%, 占比低于 1% 的物种归为一类 (其他), 共占 32.96%。与银杏比对上的基因只有 695 条, 占 2.00%, 说明银杏相关基因研究还较少。

2.2 基因功能分析与差异表达基因筛选

2.2.1 类黄酮生物合成相关基因筛选 根据对 4 个样品的整体注释, 寻找类黄酮生物合成途径相关基因的注释。同时对 KEGG 数据库类黄酮生物合成

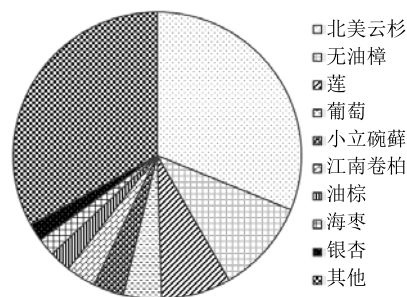


图 1 银杏 Unigene 与 Nr 数据库 BLAST 比对的物种分布
Fig. 1 Distribution of species of *Ginkgo* Unigene and Nr database BLAST

(ko00941) 和苯丙烷生物合成 (ko00940) 这 2 条途径进行基因注释分析。发现类黄酮生物合成相关基因均被注释到, 且这些基因均注释有多条 Unigene。注释到的功能基因, 见表 3。

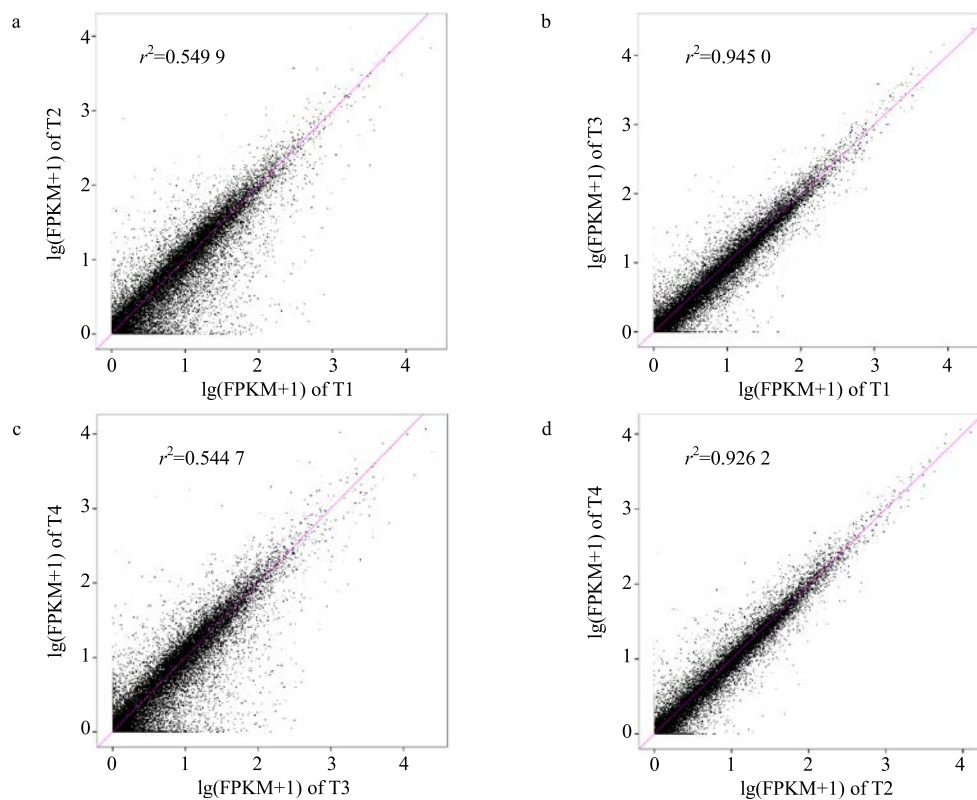
对 4 个样品之间基因的表达相关性进行比较, 从图 2 可以看出, T1 和 T3、T2 和 T4 之间相关性系数更高, 即基因在两个样品中表达模式更相近。说明相对于成年树与幼年树在叶同时期之间的差异, 叶不同时期 (幼叶与成熟叶) 之间的差异更显著。

2.2.2 差异表达基因 KEGG 富集分析 对 4 个样品的 Unigene 进行差异表达筛选共发现 5 117 个 DEG, 占总被注释 Unigene 的 14.55%。Unigene 与 KEGG 数据库比对, 851 个基因被注释, 涉及的通路 116 个, 其中富集的前 50 条通路统计如图 3 所示。富集通路主要集中在新陈代谢 (metabolism) 部分, 其中 Unigene 有 50 条以上的通路为: 苯丙烷类生物合成 (phenylpropanoid biosynthesis)、淀粉和蔗糖代谢 (starch and sucrose metabolism)、植物激素信号转导 (plant hormone signal transduction)、类黄酮生物合成 (flavonoid biosynthesis) 以及苯丙氨酸代谢 (phenylalanine metabolism)。说明与类黄酮合成相关的通路是不同样品之间 DEG 的主要富集之一。

表 3 类黄酮生物合成相关基因注释

Table 3 Flavonoid biosynthesis related gene annotation

基因名称	缩写	中文名	注释数量
phenylalanine ammonia lyase	PAL	苯丙氨酸解氨酶	12
cinnamate 4-hydroxylase	C4H	肉桂酸 4-羟化酶	8
4-coumarate: coenzyme A ligase	4CL	4-香豆酰辅酶 A 连接酶	2
chalcone synthase	CHS	查耳酮合成酶	8
chalcone isomerase	CHI	查耳酮异构酶	2
dihydroflavonol-4-reductase	DFR	二氢黄酮醇-4-还原酶	13
flavanone 3-hydroxylase	F3H	黄烷酮 3-羟化酶	6
flavonoid 3'-hydroxylase	F3'H	类黄酮 3'-羟化酶	10
flavonoid 3',5'-hydroxylase	F3'5'H	类黄酮 3',5'-羟化酶	5
flavonol synthase	FLS	黄酮醇合成酶	6
anthocyanidin synthase	ANS	花青素合成酶	3
anthocyanidin reductase	ANR	花青素还原酶	4
leucoanthocyanidin reductase	LAR	无色花色素还原酶	10
flavonoid O-methyltransferase	FOMT	类黄酮 O-甲基转移酶	7
UDP-glycose:flavonoid glycosyltransferase	UGT	类黄酮糖基转移酶	10



a-T1 与 T2 之间的比较 b-T1 与 T3 之间的比较 c-T3 与 T4 之间的比较 d-T2 与 T4 之间的比较

a-comparison between T1 and T2 b-comparison between T1 and T3 c-comparison between T3 and T4 d-comparison between T2 and T4

图 2 4 个样品之间基因表达量相关性散点图

Fig. 2 Scatter plot of gene expression levels among four samples

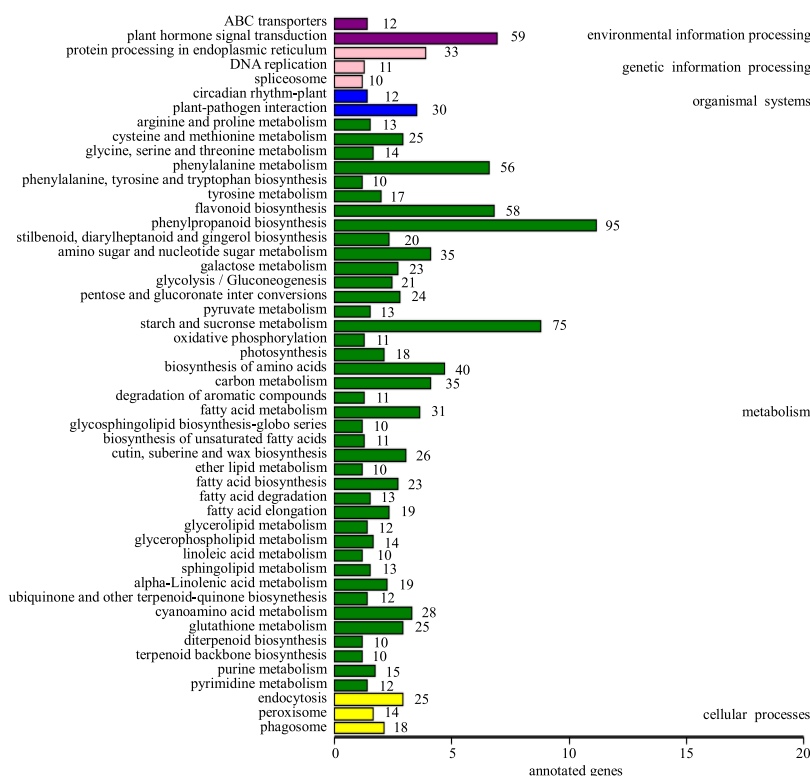


图 3 差异表达基因 KEGG 通路注释统计

Fig. 3 Differentially expressed genes KEGG pathway annotation statistics

2.3 类黄酮生物合成相关基因的表达分析

2.3.1 类黄酮生物合成关键基因聚类分析 银杏类黄酮根据其结构差异一般可分为黄酮、黄酮醇、异黄酮、黄烷酮、黄烷醇、花色素等 6 大类^[7-18]。其中，槲皮素、山柰酚、异鼠李素这 3 种黄酮醇是银杏叶总黄酮的主要成分，也是 EGb 761 质量控制中检测的标准^[19]。

通过对上一步类黄酮合成相关途径基因进行注释筛选，去除极低表达 (FPKM<0.1) Unigene，共筛选出 50 条在 4 个样品中差异表达的候选关键基因。对这 50 条 Unigene 进行基因表达聚类分析，从图 4 可以直观地发现，根据 Unigene 在不同样品中的表达水平，50 条 Unigene 可以聚为 3 类表达模式。除了中间的 5 个 Unigene 相反外，其他 Unigene 均在 T1 和 T3 高表达，即成年树和幼年树 4 月的幼叶中高表达；T2 和 T4 低表达，即成年树和幼年树 9 月的成熟叶中低表达。同时，4 个样品聚为两类，T1 和 T3 一类，T2 和 T4 一类，与图 2 结果一致。

2.3.2 类黄酮生物合成关键基因表达分析 植物在发育的不同阶段、一年中生长的不同时期其代谢是有一定差异的^[14,20]。本实验对银杏成年与幼年阶段、幼叶 (4 月) 与成熟叶 (9 月) 类黄酮生物合

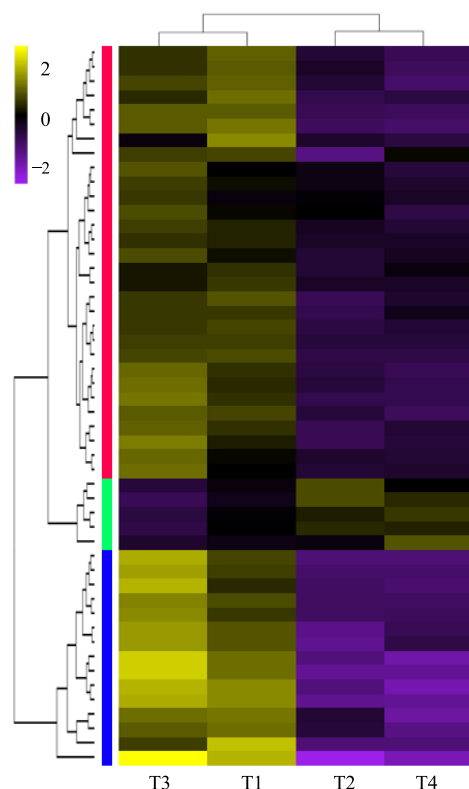
成途径中的多个关键结构基因的表达进行了比较分析。由于这些基因均有多个 Unigene，通过分析发现这些 Unigene 的表达量虽相差很大但其表达模式是一致的，故以最高表达量的 Unigene 作为注释基因表达丰度的衡量。

从图 5 可以看出，C4H、CHS、ANS、ANR 和 FOMT 基因的表达量都超过了 380，在 13 个基因里表达量相对较高，F3'H、F3'5'H 和 FLS 基因的表达量都不超过 65，在 13 个基因里表达量相对较低。UFGT 基因在各个样品中差异不显著，故图中未列出，这与张传丽等^[21]研究结果一致。F3'H、F3'5'H 在二氢黄酮醇和黄酮醇的合成中具有重要作用，FLS 则直接催化合成多种黄酮醇类，而这 3 个基因却低水平表达，阻碍了黄酮醇合成的通量。同时 PAL 是类黄酮生物合成途径的起始关键酶^[13]，其基因表达水平也相对较低。DFR、ANS、ANR 都属于花青素合成途径的重要酶类，这 3 个基因的表达量整体都很高，说明类黄酮合成途径中间产物流向花青素合成途径的通量较大。

3 讨论

3.1 转录组测序分析类黄酮生物合成

在植物体中类黄酮合成途径是目前研究的最为



不同的行代表不同的基因，颜色代表基因在样品中的表达量水平取 $\lg(\text{FPKM})$

Different rows represent different genes, the color represents the gene in the sample; the expression level take $\lg(\text{FPKM})$

图 4 DEG 聚类热图

Fig. 4 Heat map of differential gene expression

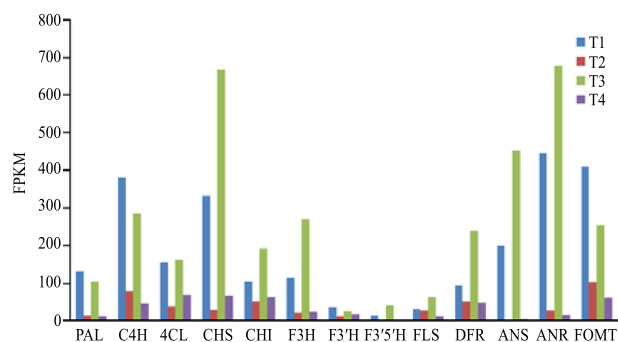


图 5 类黄酮生物合成关键基因表达量统计

Fig. 5 Statistics of expression of key genes in flavonoid biosynthesis

清楚的次生代谢途径，类黄酮物质在植物体内具有重要的生理意义，在植物的授粉、抗病虫害、抵御紫外辐射、与微生物的信号传递等诸多方面发挥重要作用^[4,7,20]。医疗上，银杏类黄酮相比较于其他植物类黄酮具有更显著的药效和较低的毒副作用^[22-23]，而成为植物药用成分开发的热点。

2016 年 11 月，银杏基因组测序破解^[24]，研究

人员分析了这个超大的基因组 ($>10 \text{ Gb}$ ，是拟南芥基因组的 80 多倍)。银杏基因组的完成填补了陆生植物史上的重要空白，为植物演化史以及银杏防御、保护、药用等研究提供了重要的遗传学基础。银杏基因组数据的公布极大地促进了银杏的系统研究，2017 年初本研究组第一时间进行了有参转录组测序。通过高通量测序，每个样品均产出超过 7 Gb clean data，共获得 43 073 条 Unigene，其中注释到 35 179 条，同时获得新基因 1 233 条。对 4 个样品进行差异表达筛选，得到 5 117 个 DEG。并进一步通过 KEGG 通路对 DEG 进行注释，筛选出 50 条与银杏类黄酮生物合成相关的候选基因，并进一步分析了基因表达。本研究前期测序获得的大量数据对后续研究类黄酮生物合成途径提供了丰富的数据资料，并对进一步关键基因的筛选挖掘奠定了基础。

3.2 银杏类黄酮生物合成关键基因的表达

通过对银杏类黄酮生物合成途径相关基因的表达分析，发现各关键酶基因均在幼叶中高表达，成熟叶中低表达，而成年树与幼年树在叶同时期各基因表达差异不显著。这与林琰等^[25]关于银杏黄酮醇苷在叶不同时期的含量测定结果相一致。

结果分析表明，在银杏类黄酮合成途径的上游阶段，CHS 和 CHI 基因的表达量相对较高，但 PAL 基因的表达量相对较低，这启发可以增强 PAL 基因的表达，以增加整条代谢通路的通量。F3'H 和 F3'5'H 可以催化二氢山柰酚分别生成二氢槲皮素和二氢杨梅素，FLS 分别催化二氢山柰酚、二氢槲皮素和二氢杨梅素生成山柰酚、槲皮素和杨梅素，同时，F3'H 和 F3'5'H 也可以通过催化山柰酚生成槲皮素和杨梅素^[10]。而根据结果分析，F3'H、F3'5'H、FLS 作为合成各种黄酮醇类的关键酶基因其表达量均很低，直接限制了黄酮醇类的合成。故通过超表达载体构建与基因工程技术大幅度提高特别是 F3'H 和 FLS 基因的表达，从而提高黄酮醇类的合成量在理论上具有一定的可行性。同时，DFR、ANS、ANR 等基因的高表达致使下游花青素合成支路通量大，间接降低了黄酮醇类合成量，为了提高银杏黄酮醇类的含量，也可通过降低、抑制 DFR、ANS、ANR 基因的表达来实现。

综合以上分析，本研究利用转录组测序技术，筛选挖掘出了银杏类黄酮生物合成途径的关键基因，并分析了各基因的表达特征，确定了银杏黄酮

醇类物质合成的限速酶基因,并对提高银杏类黄酮产量特别是黄酮醇类的含量做了分析探讨,为今后利用基因工程手段改造银杏遗传背景,提高银杏类黄酮产量,提供了分子生药理学理论基础。

参考文献

- [1] 曹福亮. 中国银杏志 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2007.
- [2] 杨 扬, 周 斌, 赵文杰. 银杏叶史话: 中药/植物药研究开发的典范 [J]. 中草药, 2016, 47(15): 2579-2591.
- [3] Cheng S Y, Feng X, Yan W. Advances in the study of flavonoids in *Ginkgo biloba* leaves [J]. *J Med Plant Res*, 2009, 3(13): 1248-1252.
- [4] 汪素娟, 康 安, 狄留庆, 等. 银杏叶提取物主要活性成分药动学研究进展 [J]. 中草药, 2013, 44(5): 626-631.
- [5] 王秀锋, 马瑞阳, 景作乾, 等. 银杏叶提取物抗肿瘤机制研究进展 [J]. 微生物学杂志, 2011, 31(6): 76-79.
- [6] 李淑琴, 朱嘉宝, 武宇洲. 银杏叶提取物防治心脑血管疾病的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2016, 25(1): 76-81.
- [7] 张传丽, 陈 鹏. 银杏类黄酮研究进展 [J]. 北方园艺, 2014(3): 177-181.
- [8] 任 非, 龚淑英. 银杏叶提取物治疗老年痴呆症 [J]. 中国组织工程研究, 2005, 32(9): 166-168.
- [9] Birks J, Grimley E J. *Ginkgo biloba* for cognitive impairment and dementia [J]. *Alzheimers Dementia*, 2006, 2(3): S367.
- [10] 郭欣慰, 黄丛林, 吴忠义, 等. 植物类黄酮生物合成的分子调控 [J]. 北方园艺, 2011(4): 204-207.
- [11] 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.
- [12] 夏 涛, 高丽萍. 类黄酮及茶儿茶素生物合成途径及其调控研究进展 [J]. 中国农业科学, 2009, 42(8): 2899-2908.
- [13] Smith J V, Luo Y. Studies on molecular mechanisms of *Ginkgo biloba* extract [J]. *Appl Microb Biotechnol*, 2004, 64(4): 465-472.
- [14] Cheng H, Li L, Cheng S, et al. Molecular cloning and function assay of a chalcone isomerase gene (GbCHI) from *Ginkgo biloba* [J]. *Plant Cell Reports*, 2011, 30(1): 49-62.
- [15] 汪贵斌, 郭旭琴, 常 丽, 等. 温度和土壤水分对银杏叶黄酮类化合物积累的影响 [J]. 应用生态学报, 2013, 24(11): 3077-3083.
- [16] 吴海霞, 吴彩娥, 李婷婷, 等. 大孔树脂纯化银杏叶黄酮的研究 [J]. 现代食品科技, 2013(12): 2964-2969.
- [17] Florea L, Li S, Salzberg S L. Thousands of exon skipping events differentiate among splicing patterns in sixteen human tissues [J]. *Fl000 Res*, 2013, 2: 188.
- [18] van Beek TA. Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts [J]. *J Chromatogr A*, 2002, 967(1): 21-55.
- [19] Maitra I, Marcocci L, Droy-Lefaix M T, et al. Peroxyl radical scavenging activity of *Ginkgo biloba* extract EGb 761 [J]. *Bioch Pharm*, 1995, 49(11): 1649-1655.
- [20] Hichri I, Barrieu F, Bogs J, et al. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway [J]. *J Exper Bot*, 2011, 62(8): 2465.
- [21] 张传丽, 陈 鹏, 仲月明, 等. 银杏类黄酮糖基转移酶基因全长序列克隆及表达分析 [J]. 园艺学报, 2012, 39(10): 1903-1912.
- [22] Rendeiro C, Rhodes J S, Spencer J P. The mechanisms of action of flavonoids in the brain: Direct versus indirect effects [J]. *Neurochem Int*, 2015, 89: 126-139.
- [23] Miglio C. Flavonoids and immune function in human: A systematic review [J]. *Crit Rev Food Sci Nut*, 2015, 55(3): 383-395.
- [24] Guan R, Zhao Y, Zhang H, et al. Draft genome of the living fossil *Ginkgo biloba* [J]. *Giga Sci*, 2016, 5(1): 49.
- [25] 林 琰, 张宏建, 陈锡林. 不同采收时间浙江不同产区银杏叶总黄酮醇苷含量测定 [J]. 中国中医药科技, 2017, 24(5): 594-598.