

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.2017.20276

祖奎玲, 董树斌, 李建霞, 徐申健, 赵良成. 南蛇藤假种皮形成过程中萜类合成基因的表达分析[J]. 植物科学学报, 2017, 35(2): 276~282
 Zu KL, Dong SB, Li JX, Xu SJ, Zhao LC. Differentially expressed genes analysis of terpenoid biosynthesis related to aril development in *Celastrus orbiculatus* Thunb.[J]. *Plant Science Journal*, 2017, 35(2): 276~282

南蛇藤假种皮形成过程中萜类合成基因的表达分析

祖奎玲, 董树斌, 李建霞, 徐申健, 赵良成*

(北京林业大学自然保护区学院, 北京 100083)

摘要: 为探究南蛇藤(*Celastrus orbiculatus* Thunb.)假种皮发育过程中萜类物质合成相关基因的表达差异, 本文选取3个不同发育时期(盛花期、落花期和幼果期)的南蛇藤雌花为实验材料, 构建3个cDNA文库, 通过Illumina HiSeq™ 2000平台进行转录组测序, 共获得87 600个unigene序列, 平均长度为453 bp, N50/N90比值为4.64。通过3个不同发育阶段基因差异表达的比较及功能富集分析, 鉴定出16个萜类合成相关基因, 其中8个基因的编码蛋白参与调控7个萜类合成代谢位点。还确定了与萜类合成相关的7个转录因子家族的成员数量以及相对表达量最高的基因。

关键词: 南蛇藤; 萜类合成; 差异基因; 转录因子

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2017)02-0276-07

Differentially expressed genes analysis of terpenoid biosynthesis related to aril development in *Celastrus orbiculatus* Thunb.

Zu Kui-Ling, Dong Shu-Bin, Li Jian-Xia, Xu Shen-Jian, Zhao Liang-Cheng*

(College of Nature Reservation, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: To research differentially expressed genes (DEGs) related to terpenoid biosynthesis in the developmental process of aril in *Celastrus orbiculatus* Thunb., three cDNA libraries from three stages (full blooming, flower senescence, and young fruit) were established and then sequenced by Illumina HiSeq™ 2000. RNA-Seq was assembled into 87 600 unigenes with a mean length of 453 bp and N50/N90 of 4.46. By differential expression analysis of pairwise comparisons and functional enrichment, 21 DEGs were confirmed to have highly differential expression related to terpenoid biosynthesis. Among them, eight genes regulated the metabolism of seven terpenoid synthetases. We also identified seven transcription factor families and high expression genes associated with terpenoid synthesis.

Key words: *Celastrus orbiculatus* Thunb.; Terpenoid biosynthesis; Differentially expressed genes; Transcription factors

萜类物质(Terpenoid)是植物生长和发育过程中产生的次生代谢产物, 可作为信号分子介导植物对植食性昆虫的防御反应, 也可参与植物对果实传播者的吸引^[1]。萜类根据其异戊二烯构成单元的

数目分为单萜(C10)、倍半萜(C15)、二萜(C20)、三萜(C30)、四萜(C40)和多萜(C>40)。植物萜类的合成与释放具有时空特异性, 花和果实是挥发性萜类含量较丰富的器官, 且萜类的合成和

收稿日期: 2016-08-06, 退修日期: 2016-09-28。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31370213); 北京市自然科学基金项目(5133036)。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31370213) and Beijing Natural Science Foundation (5133036).

作者简介: 祖奎玲(1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物发育分子生物学 (E-mail: kuilingzu@bjfu.edu.cn)。

* 通讯作者(Author for correspondence). E-mail: lczhao@bjfu.edu.cn。

积累随它们的发育阶段而发生变化^[2]。对阳春砂(*Amomum villosum* Lour.)果实不同发育阶段萜类合成情况的研究表明,单萜在幼果期含量最高,而单萜含氧衍生物和倍半萜类的含量在成熟中期最高^[3]。此外,研究发现转录因子也可参与调控萜类的合成,如在长春花(*Catharanthus roseus* (L.) G. Don)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh)等植物中发现,AP2/ERF、WRKY、锌指蛋白(Zinc Finger Protein)、bZIP等类型的转录因子可以发挥重要的调控作用^[4]。与萜类物质合成相关的转录因子在很大程度上决定了酶基因的时空表达和诱导表达的特异性和高效性。例如,含有亮氨酸拉链结构的WRKY转录因子GaWRKY1参与了棉酚(Gossypol)生物合成途径的调控^[5];青蒿(*Artemisia carvifolia* Hance)中在表皮毛部分特异表达的AP2/ERF转录因子AaORA也可促进青蒿素的生物合成^[6]。近年来,随着高通量测序技术的发展,对非模式且无参考基因组序列的植物转录本进行大规模测序,产生了海量、准确、全面的转录组信息,为植物发育过程中代谢产物合成的分子调控机理提供了数据支撑。

南蛇藤(*Celastrus orbiculatus* Thunb.)是卫矛科(Celastraceae)南蛇藤属的落叶木质藤本植物,适应性强,在园林绿化、药用等方面均具有重要价值^[7]。其茎、蔓、叶、花及果实具有很好的观赏价值,尤其是其成熟的果实开裂后呈现鲜艳的红色肉质假种皮结构,与黄色干燥的果皮形成鲜明对比。在结构上,南蛇藤假种皮是随雌花的发育而逐步形成的包被,对种子起一定的保护作用;另一方面,卫矛科某些种成熟的假种皮能够吸引鸟类和昆虫等传播者,有利于种子的传播^[8],这些特征和功能与雌花发育过程中萜类物质的合成和积累可能具有一定的相关性^[9]。目前,国内外对南蛇藤的研究主要集中在系统分类学^[10]、药用价值开发^[11]、化学成分分析^[12]和繁殖生态学^[13]等方面,对雌花发育过程中萜类物质合成及调控的分子机制等相关研究尚未见报道。

鉴于南蛇藤基因组背景信息十分缺乏,本文首先对南蛇藤的雌花和果实进行转录组学分析,在此基础上研究南蛇藤雌花发育过程中萜类合成相关基因的差异表达情况,以及与萜类生物合成相关的转录因子,以期为进一步探明南蛇藤假种皮结构的发

育机理和功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料南蛇藤雌性植株来源于中国科学院植物研究所。我们前期已对南蛇藤从开花到果实发育成熟的过程进行了形态解剖学和假种皮形态发生的特征观察。本研究分别于2015年5月3日、8日和21日采集南蛇藤同一植株盛花期(花瓣完全展开但花药未开裂,尚未传粉)、落花期(传粉后花瓣凋零)和幼果期(假种皮发育关键时期)的雌花,经液氮迅速冷冻后放入-80℃冰箱低温保存、备用。

1.2 RNA提取、cDNA文库的构建及测序

采用RNA提取试剂盒(北京天根)分别提取南蛇藤盛花期雌花、胚珠发育后凋零的花及幼果的总RNA。cDNA文库构建方法为:采用带有Oligo(dT)的磁珠富集mRNA;加入fragmentation buffer将mRNA打断成短片段,以打断后的mRNA为模板,采用六碱基随机引物合成第一条cDNA链,随后加入缓冲液、dNTPs、RNase H和DNA polymerase I合成第二条cDNA链;采用AMPure XP beads纯化双链cDNA。将纯化的双链cDNA进行末端修复、加A尾并连接测序接头,再用AMPure XP beads进行片段大小选择,最后进行PCR扩增,反应程序为:95℃预变性10 min;95℃变性10 s,60℃退火30 s,共40个循环;反应设3次重复。采用AMPure XP beads纯化PCR产物及Qubit 2.0初步定量,稀释文库至1.5 ng/μL,随后使用Agilent 2100生物分析仪对文库的insert size进行检测;符合预期后,使用Q-PCR方法对文库的有效浓度进行准确定量(文库有效浓度>2 nM),检验文库质量。建好的测序文库采用Illumina HiSeq™ 2000测序仪进行测序(北京诺禾致源)。

1.3 测序数据质量评估与过滤

测序仪产生的原始图像数据经base calling转化为序列数据(raw reads)。为保证信息分析质量,须对raw reads进行过滤,去除接头(adapter),N(表示无法确定的碱基信息)比例大于10%的reads以及低质量reads(质量值Qphred≤20的碱基数占整个reads 50%以上),过滤后获得纯净reads(clean reads),用于后续研究。

1.4 序列组装及 unigene 功能注释

对获取的 clean reads 采用 Trinity (r20140413p1) 软件^[14] 进行序列拼接, 得到转录本序列 (transcript), 作为后续分析的参考序列。以每条基因中最长的转录本作为 unigene, 进行后续分析。为获得全面的基因功能信息, 分别通过 BLASTX 将 unigene 序列与蛋白数据库 Nr (NCBI, non-redundant database)、Swiss-Prot、KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes database) 和 KOG (clusters of orthologous groups of proteins) 进行比对; 利用 BLASTn 将 unigene 序列与核酸数据库 Nt (nucleic acid database) 进行比对, 得到与给定 unigene 具有最高序列相似性的基因或蛋白, 从而获取该 unigene 的相关基因和蛋白功能注释信息。根据 Nr 注释信息, 使用 Blast2GO 软件得到 unigene 的 GO (gene ontology, <http://www.geneontology.org/>) 注释信息, 并对所有 unigene 做 GO 功能富集分析。

1.5 差异表达基因的筛选和功能注释

采用 FPKM (fragments per kilobase of transcript sequence per millions base pairs sequenced) 方法计算基因表达量^[15]。采用 TMM 软件 (trimmed mean of M values) 对 read count 数据进行标准化处理, 再使用 DEGseq 软件进行差异分析, 阈值设为 $q\text{-value} < 0.005$ 且 $\log_2(\text{Fold Change}) > 1$, 筛选出两两样本间的差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs)。将所有差异表达基因在 GO 数据库和 KEGG 数据库 (<http://www.kegg.jp/kegg/>) 中进行功能富集分析。

2 结果与分析

2.1 南蛇藤测序样本及数据质量

通过对 GC 含量分布的检验控制原始数据质量。本研究 3 个 cDNA 文库测序循环上的 GC 及 AT 含量相等, 且在整个测序过程基本稳定不变, 呈水平线(图 1), 说明测序质量较好。原始数据经过滤后分别获得 5.2、5.35、5.56 G 的 clean reads。组装结果显示, 质量值 Q20 平均为 94.11%, Q30 平均为 88.73%, 序列碱基 GC 含量平均值为 44.01%, 碱基错误率为 0.04%, 表明

测序数据准确度高, 可满足后续分析研究的要求(表 1)。

2.2 转录本组装及基因功能注释

数据拼接结果显示, transcript 和 unigene 长度的平均值分别为 1101 bp 和 749 bp, 将转录本从长到短排序并依次累加转录本碱基数, 累加值达到转录本总碱基数的 50% (N50) 和 90% (N90) 时, unigene 中 N50/N90 的值为 4.64 (表 2), 该值越大, 反映组装得到的长片段越多, 组装效果越好。实验结果表明组装的结果较好, 可用于后续分析和信息挖掘工作。将获取的 87 600 个 unigene 在 7 大数据库中进行功能注释, 在 Nr 蛋白序列数据库获得注释的 unigene 数量为 31 971 条, 是获得注释最多的数据库, 占全部注释序列的 36.49%; 其次是 GO 和 SwissProt 数据库(表 3)。

2.3 与萜类合成相关的差异基因表达及功能富集分析

通过对 3 个不同发育时期的转录组数据进行两两比对及功能富集分析, 获得了与萜类物质合成相关的差异表达基因。其中, 主要涉及到萜类骨干化合物、二萜、单萜、倍半萜和四萜合成 5 个相关通路。16 个基因在 3 个发育时期表达程度不同。基因 c27995_g1、c43496_1、c35366_g1、c31090_g1、c42602_g1、c40417_g1 和 c42148_g1 在盛花期相对表达量最高, 而在幼果期最低; 基因 c72891_g1、c35784_g1、c40261_g1、c33369_g1、c36117_g1、c40486_g1、c39661_g1、c40777_g1 和 c3899_g1 在幼果期相对表达量最高(图 2)。

2.4 南蛇藤萜类物质合成代谢位点的确定

萜类物质合成的 2 条途径中 (ID: ko00900), 甲羟戊酸 (MVA) 途径和 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸 (2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP) 途径共有 8 个 unigene 参与 7 个代谢位点的调控(图 3)。其中, MVA 途径总共涉及到 4 个代谢位点, 分别为乙酰乙酰 CoA 硫解酶 (acetyl-CoA acetyl transferase, ACOT) (c44448_g2)、3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 合成酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase, HMGS) (c40417_g1)、3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, HMGR) (c18757_g1, c40544_g1) 和甲羟戊酸激酶 (mevalonate kinase,

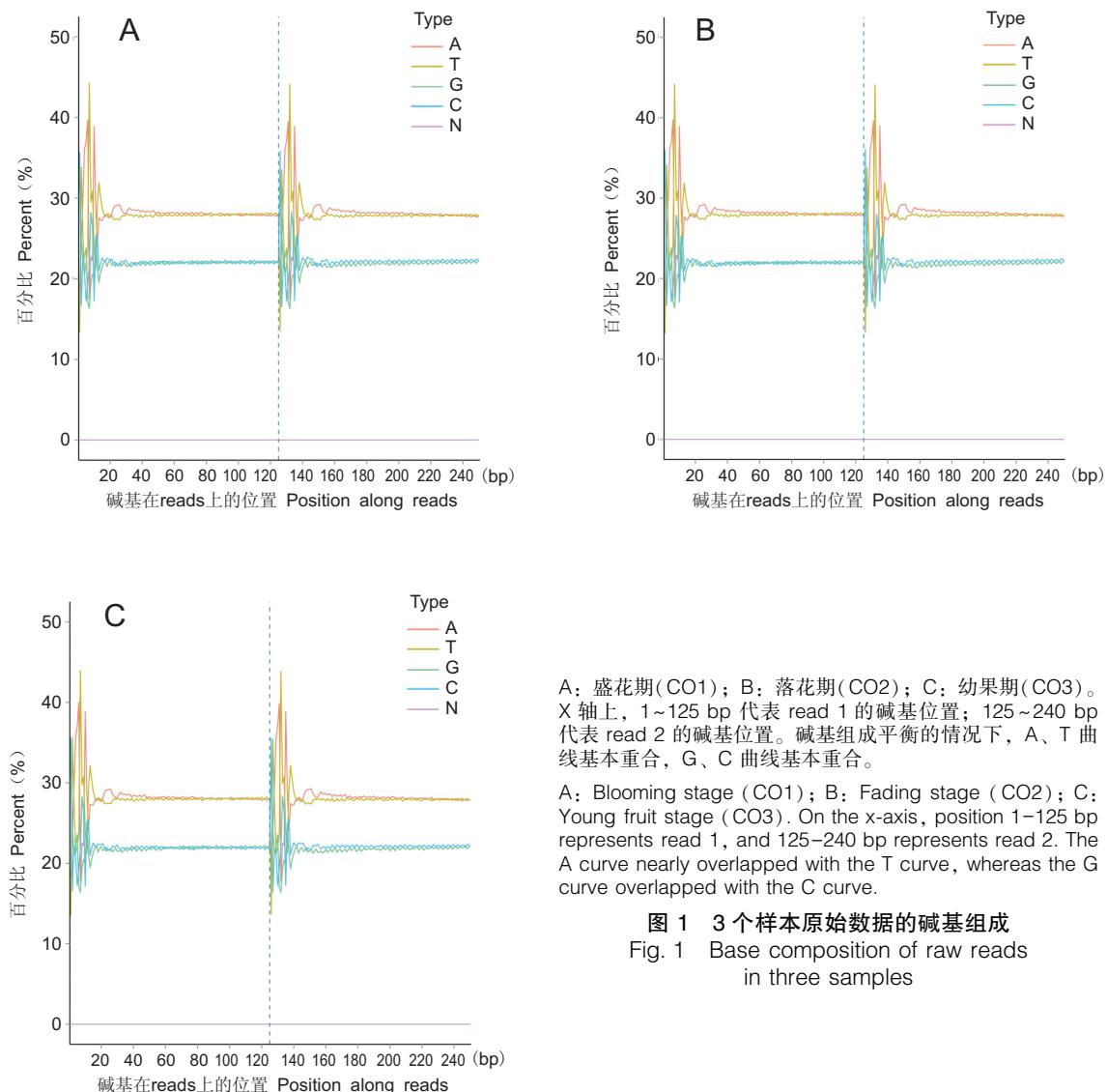


表 1 南蛇藤测序数据质量

Table 1 Summary of sequencing data quality in *Celastrus orbiculatus*

样本 Sample	原始数据量 Number of raw reads	有效数据量 Number of clean reads	错误率 (%) Error	Q20 (%)	Q30 (%)	GC 含量 (%) GC content
CO1	44 577 992	41 560 806	0.04	94.15	88.79	44.1
CO2	46 188 934	42 789 340	0.04	93.88	88.34	43.99
CO3	47 586 654	44 496 748	0.04	94.31	89.07	43.93

表 2 拼接长度分布情况
Table 2 Distribution of splice length

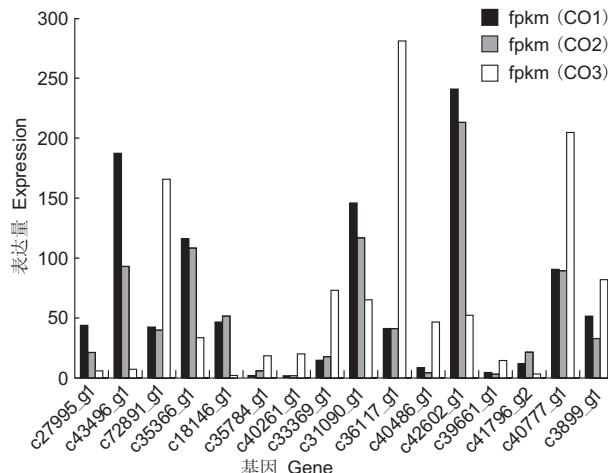
Data	最小值 Min length (bp)	平均值 Mean length (bp)	中间值 Median length (bp)	最大值 Max length (bp)	N50	N90	总核苷酸 Total nucleotides (bp)
Transcripts	201	1101	557	18 305	2093	408	140 083 075
Unigenes	201	749	390	18 305	1328	286	65 593 438

表 3 7 大数据库基因注释结果

Table 3 Summary of annotations in seven public protein databases

蛋白质数据库 Protein database	unigene 数目 No. of unigene hit	百分比(%) Percentage
NR	31 971	36.49
NT	24 585	28.06
KO	11 957	13.64
SwissProt	25 693	29.32
PFAM	25 259	28.83
GO	25 914	29.58
KOG	14 394	16.43
Total	87 600	100

MK) (c30657_g1); MEP 途径涉及到脱氧木酮糖-5-磷酸合酶(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, DXS) (c43496_g1)、2-甲基赤藓糖-2,4-环二磷酸合酶(2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase, MCS) (c31090_g1) 和 4-羟基-3-甲基丁烯-二磷酸还原酶(4-hydroxy-3-meth-



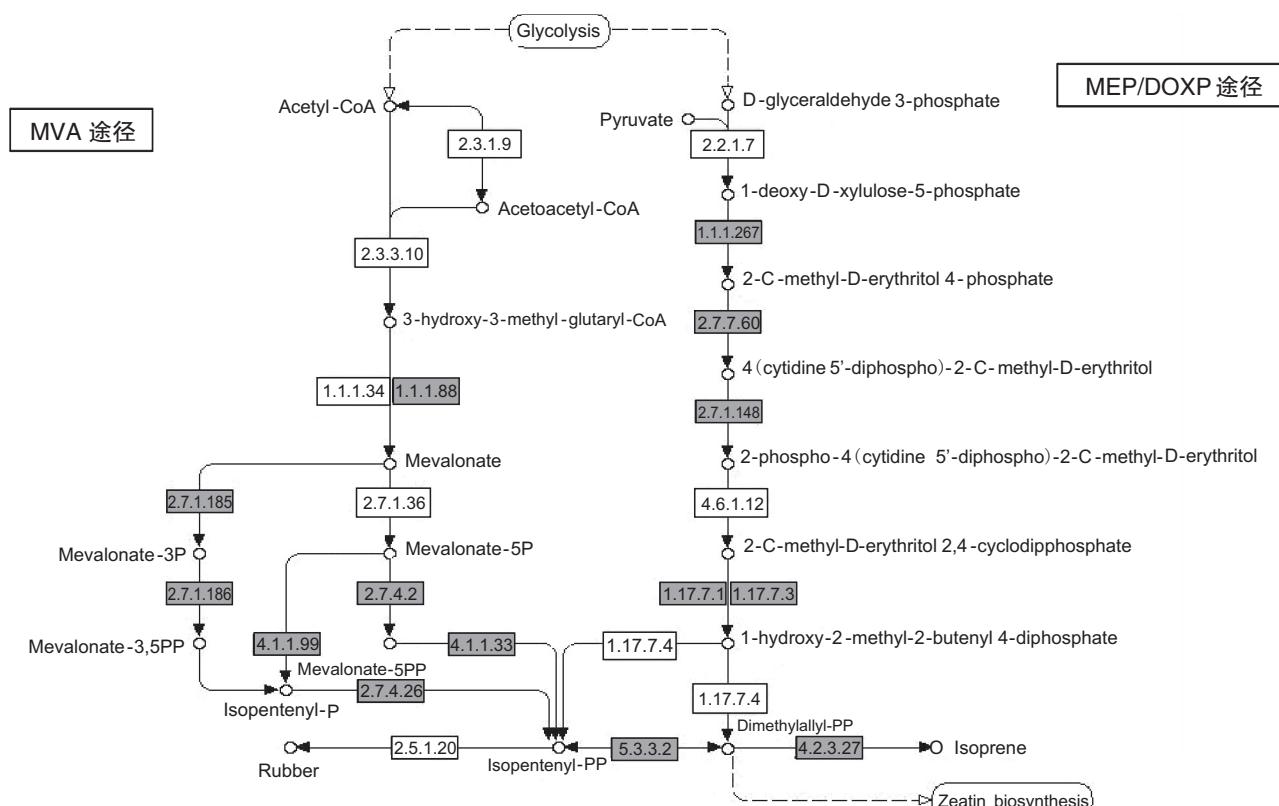
CO1: 盛花期; CO2: 落花期; CO3: 幼果期。

CO1: Blooming stage; CO2: Fading stage; CO3: Young fruit stage.

图 2 与萜类合成相关的差异基因表达分析

Fig. 2 Differently expressed genes related to terpenoid biosynthesis

ybut-2-en-1-yl diphosphate reductase, HMBPP) (c42148_g1) 3 个代谢位点。

图 3 萜类物质合成代谢通路分析
Fig. 3 Metabolic pathways of terpenoid biosynthesis

2.5 与萜类物质合成相关的转录因子

使用iTAK软件分析转录组数据得到所有转录因子的家族信息,通过在数据库中比对得到与萜类合成相关的基因,从中确定与萜类物质合成相关的7个转录因子家族。这些基因家族 unigene 的数目分别为: AP2-EREBP 家族 117(25%); WRKY 家族 71(15%); bHLH 家族 83(17%); bZIP 家族 64(13%); C2H2 家族 128(27%); zf-HD 家族 14(3%)(图 4)。同时,利用FPKM方法^[15]计算3个发育时期基因的表达量。在各类转录因子家族中也鉴定出相对表达量最高的基因,其中WRKY40在3个发育时期均有较高表达量,且在盛花期相对表达量最高,说明在假种皮发育起始阶段,该基因可促使萜类物质的合成(表 4)。

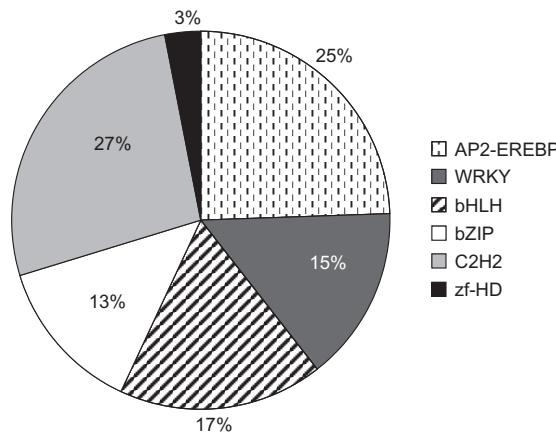


图 4 与萜类物质合成相关的转录因子家族所占的比例

Fig. 4 Percentage of transcription factor families related to terpenoid biosynthesis

3 讨论

作为重要的药用及观赏植物,南蛇藤目前非常

缺乏基因组背景信息,因此也限制了对其果实和假种皮等重要生殖结构发育机理及功能的深入研究。本文利用转录组测序的方法,获得了 87 600 个 unigene,它们的平均长度为 749 bp, N50/N90 值为 4.64。说明本次数据组装的效果较好,为遗传背景信息缺乏的南蛇藤等非模式物种的研究奠定了良好的基础。

根据前期组织发生学研究结果,南蛇藤雌花盛花期是假种皮起始发育的时期,而幼果期是假种皮生长发育的主要时期^[16]。本研究对大量与南蛇藤雌花发育相关的基因进行了功能注释,并利用FPKM 法对 3 个不同发育时期的数据进行了差异基因表达分析^[17]。在消除了基因长度和测序量差异对基因表达丰度的影响之后,FPKM 数据显示,南蛇藤幼果期与萜类合成相关的显著表达的差异基因数目较多,盛花期时也有较多基因参与了萜类物质的合成,表明在假种皮起始发育阶段相应基因也参与其中。在萜类物质合成的 2 条途径中, HMGR 作为 MVA 途径第一个限速酶,已在马铃薯 (*Solanum tuberosum L.*)、棉属 (*Gossypium*) 等植物中得到广泛研究,证明其在萜类化合物的代谢中起到重要调控作用^[18]。本研究在南蛇藤中也检测到该酶在幼果期相对表达量最高,表明随果实的发育,萜类的合成量增加,这与假种皮的生长发育过程同步。转录因子通过激活植物萜类合成途径中多个基因的表达,可有效启动或关闭萜类代谢合成途径,从而调节萜类物质的合成。目前,已知与萜类次级代谢物生物合成相关的 AP2/ERF 和 WRKY 等转录因子家族在其合成调控中起到关键作用^[4]。南蛇藤与萜类物质合成相关的转录因子中, unigene 数目最多的为 C2H2 家族,其次为 AP2-EREBP 家族。这

表 4 部分与萜类合成相关的高表达基因组成

Table 4 High expression genes associated with terpenoids biosynthesis

基因 ID Gene ID	基因名称 Gene name	FPKM (CO1)	FPKM (CO2)	FPKM (CO3)	基因长度 (bp) Gene length
c41912_g1	SAP11	33.88	45.17	48.98	1973
c35307_g3	ERF113	244.54	192.04	47.84	1924
c37658_g2	BPE	176.75	96.99	14.64	2087
c37054_g2	WRKY40	344.76	131.81	213.07	2060
c29281_g1	OBF1	105.57	146.09	56.29	1581
c41021_g1	ZHD6	12.46	12.32	17.12	2023

注: CO1, 盛花期; CO2, 落花期; CO3, 幼果期。

Notes: CO1, Blooming stage; CO2, Fading stage; CO3, Young fruit stage.

些基因信息的发掘丰富了资源植物南蛇藤的分子数据,为进一步研究南蛇藤属植物假种皮结构的分子发育机理奠定了基础。

参考文献:

- [1] 吴燕, 郭蕴斐, 卢山. 植物的防御性萜类挥发信号分子 [J]. 植物生理学报, 2012, 48(4): 311–317.
Wu Y, Guo YF, Lu S. Plant terpenoid volatiles as defensive signals [J]. *Plant Physiology Journal*, 2012, 48 (4): 311–317.
- [2] 王凌健, 方欣, 杨长青, 李建戎, 陈晓亚. 植物萜类次生代谢及其调控 [J]. 中国科学: 生命科学, 2013, 43 (12): 1030–1046.
Wang LJ, Fang X, Yang CQ, Li JR, Chen XY. Biosynthesis and regulation of secondary terpenoid metabolism in plants [J]. *Science China: Life Sciences*, 2013, 43 (12): 1030–1046.
- [3] 于安民. 基于 RNA-Seq 的阳春砂果实发育过程中糖和萜类代谢的研究 [D]. 广州中医药大学, 2014.
Yu AM. Research on the sugar and terpenoid metabolism during the *Amomum villosum* Lour. fruit development using RNA-Seq [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2014.
- [4] 赵恒伟, 葛锋, 孙颖, 刘迪秋, 陈朝银. 植物萜类物质生物合成的相关转录因子及其应用前景 [J]. 中草药, 2012, 43 (12): 2512–2519.
Zhao HW, Ge F, Sun Y, Liu DQ, Chen CY. Transcription factors involved in plant terpenoid biosynthesis and their application prospect [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2012, 43(12): 2512–2519.
- [5] Xu YH, Wang JW, Wang S, Wang JY, Chen XY. Characterization of GaWRKY1, a Cotton transcription factor that regulates the sesquiterpene synthase Gene (+)- δ -Cadinene Synthase-A [J]. *Plant Physiol*, 2004, 135 (1): 507–515.
- [6] Lu X, Zhang L, Zhang FY, Jiang WM, Shen Q, Zhang LD, Lü ZY, Wang GF, Tang KX. AaORA, a trichome-specific AP2/ERF transcription factor of *Artemisia annua*, is a positive regulator in the artemisinin biosynthetic pathway and in disease resistance to *Botrytis cinerea* [J]. *New Phytol*, 2013, 198(4): 1191–1202.
- [7] 胡铁锋. 南蛇藤 (*Celastrus orbiculatus* Thunb.) 胚胎学研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2009.
Hu TF. Study on embryology of *Celastrus orbiculatus* Thunb. [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2009.
- [8] Simmons MP. Flowering plants: Celastraceae [M]//Kubitzki K ed. The Families and Genera of Flowering Plants. New York: Springer, 2004.
- [9] 赵武. 七种植物假种皮与肉质种皮化学成分与功能研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2015.
Zhao W. Study on components and function of the aril and sarcotesta in seven plants [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2015.
- [10] 沐先运. 中国南蛇藤属(卫矛科)的分类修订 [D]. 北京: 北京林业大学, 2012.
Mu XY. Taxonomic revision of *Celastrus* L. (Celastraceae) in China [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2012.
- [11] Park HJ, Cha DS, Jeon H. Antinociceptive and hypnotic properties of *Celastrus orbiculatus* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(3): 1240–1244.
- [12] Wu J, Zhou Y, Wang L, Zuo J, Zhao W. Terpenoids from root bark of *Celastrus orbiculatus* [J]. *Photochem*, 2012, 75: 159–168.
- [13] 赵同欣, 刘林德, 张莉, 王艳杰, 贾兴军. 南蛇藤花粉和柱头的生物学特性研究 [J]. 植物研究, 2014, 34 (3): 309–316.
Zhao TX, Liu LD, Zhang L, Wang YJ, Jia XJ. Bionomics of pollen and stigma of *Celastrus orbiculatus* Thunb. [J]. *Plant research*, 2014, 34(3): 309–316.
- [14] Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng QD, Chen ZH, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, Palma FD, Birren BW, Nusbaum C, Toh KL, Friedman N, Regev A. Full length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome [J]. *Nat Biotech*, 2011, 29(7): 644–652.
- [15] Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, Baren MJ, Salzberg SL, Barbara J, Wold BJ, Pachter L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation [J]. *Nat Biotech*, 2010, 28 (5): 511–515.
- [16] 李建霞. 杨柳科和卫矛科种子附属物的发生、发育研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2013.
Li JX. Morphogenesis and development on seed appendages in Salicaceae and Celastraceae [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2013.
- [17] Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq [J]. *Nat Methods*, 2008, 5(7): 621–628.
- [18] Bach TJ, Rogers DH, Rudney H. Detergent-solubilization, purification, and characterization of membrane-bound 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from radish seedlings [J]. *Eur J Biochem*, 1986, 154 (1): 103–111.