

# 泡泡刺高通量转录组鉴定及其黄酮类代谢途径初步分析

马婧<sup>1</sup>, 邓楠<sup>1</sup>, 褚建民<sup>1</sup>, 纪敬<sup>1</sup>, 史胜青<sup>1</sup>, 江泽平<sup>1</sup>, 成铁龙<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091; 2. 南京林业大学, 江苏 南京 210037)

**摘要:** [目的] 为了更好的了解泡泡刺黄酮类生物合成途径及其潜在的抗逆作用, [方法] 应用高通量 RNA-seq 测序技术对泡泡刺当年生新叶进行了转录组测序及相关生物信息学分析。 [结果] 表明: 泡泡刺当年生叶中获得了 13 013 444 total reads, 总核苷酸数为 1 171 209 960 bp(1.09 Gb), 组装拼接后得到 48 921 条 unigene 序列; Nr、Swiss-Prot、COG、GO、KEGG 等数据库分析显示, 有 30 407 个 Nr 注释, 19 671 个 Swissprot 注释, 9 273 个 COG 功能注释, 46 153 个 GO 功能注释, 13 654 个 KEGG 注释, 并从 KEGG 通路中找到参与黄酮类化合物合成途径的关键基因片段 186 个。 [结论] 本研究获得了较好的泡泡刺转录组序列信息, 并且其中富含黄酮类化合物代谢途径的相关基因, 这为其抗逆机制、药用价值的研究及开发利用提供宝贵资源。

**关键词:** 泡泡刺; 转录组; RNA-seq; 黄酮类化合物

中图分类号: S718.5

文献标识码: A

## High-throughput Transcriptome Identification and Flavonoids Metabolic Pathways in *Nitraria sphaerocarpa*

MA Jing<sup>1</sup>, DENG Nan<sup>1</sup>, CHU Jian-min<sup>1</sup>, JI Jing, SHI Sheng-qing<sup>1</sup>, JIANG Ze-ping<sup>1</sup>, CHENG Tie-long<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

**Abstract:** [Objective] To understand the biosynthetic pathway of flavonoids and its roles in the adaptation to abiotic stresses in *Nitraria sphaerocarpa*. [Method] High-throughput RNA-seq technology was used to generate the transcriptome of current-year leaves, and then the related bioinformatics analysis was performed. [Result] The results showed that 13 013 444 raw reads and 48 921 unigenes were acquired after de novo assembly; 30 407 annotations were acquired from Nr database, 19 671 from Swiss-Prot database, 9 273 from COG database, 46 153 from GO database and 13 654 from KEGG database after function annotation against five databases; 186 unigenes were associated with flavonoid biosynthesis by the analysis of KEGG pathway. [Conclusion] The better transcriptomic data was obtained, and it was rich in the genes involved in flavonoids biosynthesis, which would provide references for the studies of its resistance, medicinal value in future.

**Key words:** *Nitraria sphaerocarpa*; transcriptome; RNA-seq; flavonoids

白刺属 (*Nitraria* L.) 植物属于蒺藜科 (Zygophyllaceae), 为耐盐、耐高温、耐风蚀沙埋、超旱生的

低矮灌木; 广泛分布在亚洲、欧洲、非洲和澳大利亚沙漠地区<sup>[1]</sup>, 是我国西北地区重要建群种之一, 能够

在极度缺水、极端气温、伴有高盐的环境中生长<sup>[2-3]</sup>。该属植物不仅能够防风固沙、改善土壤物理性<sup>[4]</sup>,还因富含黄酮和生物碱等多种生物活性次生代谢物而具有潜在的开发价值<sup>[5-6]</sup>。该物种已被作为研究极端生境植物抗逆机制的理想材料之一。目前,对白刺抗逆机理研究的报道主要在物候响应<sup>[7]</sup>、解剖结构特性<sup>[8]</sup>、活性氧代谢<sup>[9]</sup>、耐盐基因克隆<sup>[10]</sup>、蛋白质组表达<sup>[3,11]</sup>等方面,由于黄酮类化合物不仅能够治疗和预防衰老、心血管病等<sup>[12]</sup>,而且能够增强植物抵御逆境胁迫适应<sup>[13]</sup>,所以,对其合成代谢过程的关键酶也有较好的研究,如 CHS(查耳酮合成酶)<sup>[14]</sup>、CHI(查耳酮异构酶)<sup>[15]</sup>、IFS(异黄酮合成酶)<sup>[16]</sup>等基因。这些相关基因的产物对提高植物逆境胁迫适应具有非常重要的作用<sup>[13]</sup>;然而,目前有关逆境条件下白刺转录组及黄酮类生物合成途径的研究报道较少。因此,本研究在笔者对白刺属植物开展蛋白质组学研究<sup>[3,11]</sup>的基础上,以泡泡刺(*Nitraria sphaerocarpa* Maxim)为研究对象,通过对其转录组数据的生物信息学分析及其黄酮类生物合成途径相关基因的发掘,不仅可为该属植物抗逆分子机制及相关基因功能的研究奠定基础,还可为其药用价值的研究和开发提供宝贵资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

研究地位于甘肃省敦煌市(40°05' N; 94°42' E),该区降水稀少,多年平均降水量仅 40 mm,且主要集中在夏秋季节(5—9月)。试验地位于市区以东 30 km 处的山麓砾石洪积扇边缘,土壤为石质荒漠土,植被以泡泡刺为主,并形成泡泡刺灌丛沙包。本研究在生长环境相对一致的区域,采用模拟增雨的方法连续 2 年对天然泡泡刺灌丛进行处理。增雨从 2009 年开始,并持续到采样期(2010 年 8 月中旬)。以当地的多年平均降水量 40 mm 为基准,分别人工补水 0% 和 200%,并在每年生长季节(5—9月)分 5 次完成。每次增雨在 10 号左右的上午 10:00 前进行,具体材料培养详见刘殿军等<sup>[2]</sup>的方法。第 2 年的 8 月中旬分别采集 2 个增雨处理的当年生新叶,立即液氮保存,带回实验室,分别提取 RNA,等量混合后建立测序文库。

### 1.2 RNA 提取

总 RNA 提取采用 Trizol 方法,并用 DNase I 进行 DNA 消化处理,随后检测总 RNA 完整性和质量

(1.2% 琼脂凝胶电泳);然后将 2 个处理的总 RNA 进行等量混合后,进行 mRNA 分离纯化。

### 1.3 转录组测序

使用随机引物及逆转录酶将片段化处理的 mRNA 反转录为第一链 cDNA 片段,随后合成第二链 cDNA;利用试剂盒(QIAquick PCR Purification Kit)对双链 cDNA 片段进行纯化,然后对其进行末端修复及 3' 末端加 'A' 碱基;将 cDNA 片段两端连接上特定的测序接头,电泳回收、PCR 扩增测序样本,并在华大基因公司(深圳)采用 Illumina HiSeq™ 2000 进行测序。

### 1.4 数据的组装及注释

对测序产生的片段进行 k-mer(将 1 条读出的序列片段,即 read,连续切割,相邻碱基划动得到的一系列长度为 k 的核苷酸序列)长度的重叠拆分,然后进行校正(包括对具有相同前缀但末端核苷酸不同的 k-mer 进行校正和排除)。当校正后全部测序片段成为 k-mer 并且过滤掉可能有错误的 k-mer 后,将丰度最大、出现频率最高的 k-mers 作为 k-mers seed(使用特殊算法选择基础 k-mers 长度)。采用 Repeat-Scout 算法来选择 seed,5' 端至 3' 端方向或 3' 端至 5' 端的覆盖度指导原则延伸组装转录组序列。在组装拼接和合并组装拼接中,参数  $k = 25$ 。接着用 Blast 软件将所获得的 Unigene 序列分别与 Nr(NCBI 非冗余蛋白数据库)、COG 数据库和 Swiss-Prot 数据库比对( $e\text{-value} < 0.000\ 01$ ),进行功能注释和分类处理;再对 Unigene 序列进行 GO 功能注释和分类,并用软件对 GO 注释结果分类作图,然后将 Unigene 与 KEGG 数据库进行比对,分析相关的代谢通路。

## 2 结果与分析

### 2.1 泡泡刺转录组测序结果

对泡泡刺转录组测序共得到 13 013 444 total reads,共计 1 171 209 960 bp(1.09 Gb),经 Trinity 软件组装共获得 414 532 个 Contig;进一步通过 paired-end joining 和 gap-filling 方法,获得 67 591 个 Scaffold;最后通过 TGICL 软件聚类分析得到 48 921 个 unigene(表 1)。Contig, Scaffold 和 Unigene 序列的平均长度分别为 135、361、454 bp, N50(N50:将拼接转录本按照长度从长到短排序,累加转录本的长度到不小于总长 50% 的拼接转录本的长度)分别为 91、515、591 bp。Contig 序列长度为 75~4 227 bp,长度

在 200 ~ 500 bp 的序列数量最多,约占 Contig 总数的 97.27%。Unigene 序列长度分布在 150 ~ 4 915 bp,长度在 200 ~ 500 bp 的序列数所占比例最多,约占 Unigene 总数的 73.43% (数据未列出)。以上结果说明,泡泡刺转录组测序质量相对较好,测序数据准确度较高,能够满足后续分析研究的要求。

表 1 泡泡刺测序数据统计结果

组装结果	数量
Reads/个	13 013 444
Total nucleotides/bp	1 171 209 960
Contigs/个	414 532
Scaffolds/个	67 591
Unigenes/个	48 921

## 2.2 泡泡刺转录组功能注释

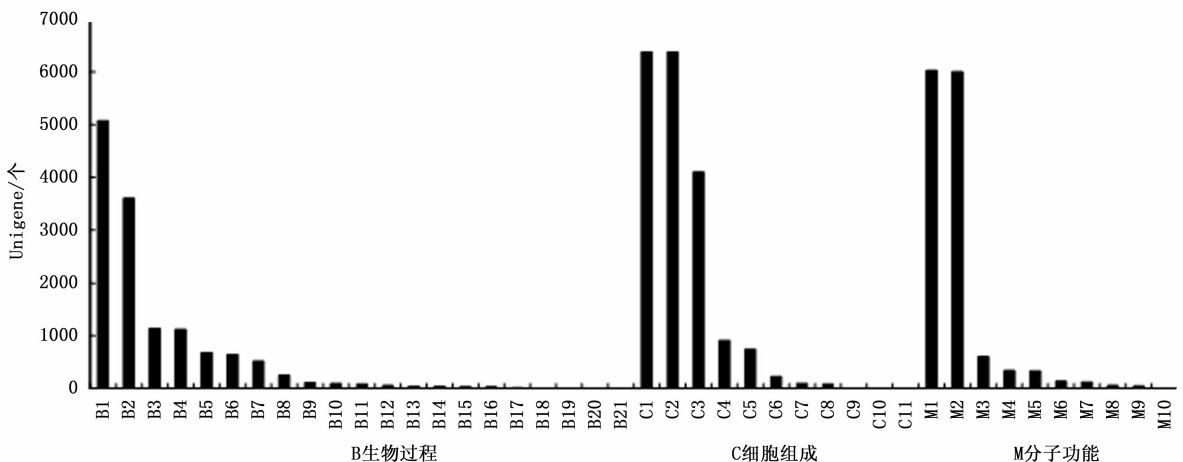
2.2.1 注释结果统计 将获得的 48 921 个 Unigene 序列分别与多个数据库进行比对,包括 Nr、Swiss-prot、COG、GO 和 KEGG (表 2)。本次注释的结果相对较好,注释成功率相对较高,例如 Nr 数据库中获得注释序列最多,总数为 30 407 条,占全部 Unigene 序列总数的 62.16%。

2.2.2 GO 分类分析 Gene Ontology (GO) 是一个国际化的基因功能分类体系,能比较全面描述生物体中基因和基因产物的属性。将全部 48 921 个

表 2 泡泡刺转录组功能注释总结果

数据库	注释序列总数/个	百分比/%
Nr	30 407	62.16
Swiss-prot	19 671	40.21
COG	9 273	18.96
KEGG	13 654	27.91
GO	46 153	94.34

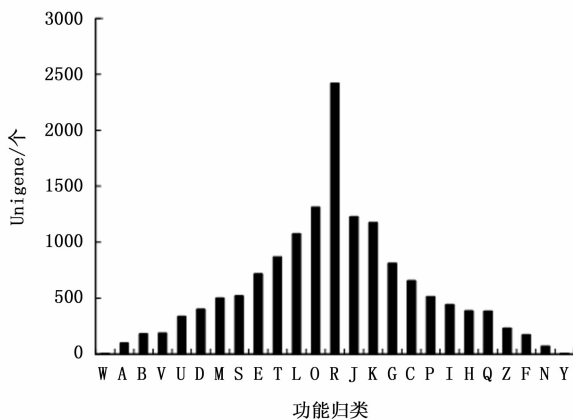
Unigene 序列进行 GO 功能分类,共获得 46 153 个 GO 注释的一致序列,涉及到 42 种生物功能基因,可分为 3 大类:生物过程(13 556 个,29.37%)、细胞组分(18 933 个,41.02%)和分子功能(13 664 个,29.61%),表达基因最多的为细胞组分中的 C1(细胞)和 C2(细胞组分),均为 6 375 个(13.81%),这一分类结果显示了泡泡刺叶片基因表达谱的总体情况(图 1)。黄酮类代谢途径所属代谢过程 B1 有 5 078 个(12.37%),它是生化过程获得注释序列最多的部分;同时,在生物过程的 B5(刺激反应)、B6(生物调节)部分中,发现了 GO 注释的 Unigene;同样在 B16(死亡)、B18(免疫系统过程)和 B19(细胞杀伤)也发现了 GO 注释的 Unigene,但数量较少。以上基因可能直接参与了泡泡刺的胁迫响应过程,这些基因的发掘为其抗逆机制、品质改良等研究奠定了基础。



B: B1 代谢过程; B2 细胞过程; B3 定位; B4 胞内定位的建立; B5 刺激反应; B6 生物调节; B7 染色; B8 细胞组分组织; B9 细胞组分的生物合成; B10 涉及多细胞有机体的过程; B11 发育过程; B12 解剖结构的形成; B13 多生物过程; B14 繁殖; B15 繁殖过程; B16 死亡; B17 生长; B18 免疫系统过程; B19 细胞杀伤; B20 节律性过程; B21 生物附着。C: C1 细胞; C2 细胞组分; C3 细胞器; C4 高分子配合物; C5 细胞器组分; C6 膜; C7 膜蛋白; C8 胞外区; C9 胞外区组分; C10 病毒; C11 病毒组分。M: M1 催化活性; M2 结合; M3 载体活性; M4 结构分子活性; M5 分子转导活性; M6 转录调节因子活性; M7 酶调节活性; M8 转录调节活性; M9 抗氧化活性; M10 电子载体活性。

图 1 泡泡刺转录组 Unigene 的 GO 分类图

2.2.3 COG 分类分析 将获得的 Unigene 序列进行 COG 数据库比对分析后,共获得 9 273 个 COG 功能注释,包括 25 个功能分类(图 2)。R 类(一般功能预测) Unigene 数量为 2 419 个,占注释总数的 16.50%,是获得注释数量最多的部分。值得关注的是黄酮类代谢途径所属的 Q 类(次生代谢产物生物合成、运输和分解代谢),共获得了 382 个(2.61%)注释,但涉及到的具体次生代谢通路还需通过 KEGG 代谢通路进一步分析;同时,在 T 类(信号传导机制)和 V 类(防御机制)也获得了注释的 Unigene,这些注释到的相关基因可能参与了泡泡刺的胁迫响应过程。



A RNA 加工和修改; B 染色体结构等; C 能量生产和转换; D 细胞周期调控、细胞分裂、染色体分区; E 氨基酸的运输和代谢; F 核苷酸运输与代谢; G 碳水化合物的运输和代谢; H 辅酶运输与代谢; I 脂类运输和代谢; J 翻译、核糖体结构和生物转化; K 转录; L 复制、重组和修复; M 细胞壁/膜/包膜生物合成; N 细胞运动; O 蛋白质翻译后修饰、蛋白转换、分子伴侣; P 无机离子运输与代谢; Q 次生代谢产物合成、运输和分解代谢; R 一般功能预测; S: 未知功能; T 信号传导机制; U 细胞内运输、分泌和膜泡运输; V 防御机制; W 细胞外结构; Y 核结构; Z 细胞骨架。

图 2 泡泡刺转录组 Unigene 的 COG 分类图

2.2.4 KEGG 注释 通过对泡泡刺的 13 654 个 Unigene 进行 KEGG 分析发现,共有 125 个 KEGG 代谢通路,其中,代谢途径、剪接体和植物病原菌互作是获得注释最多的 3 个。表 3 展示了注释数量最多的前 30 个代谢通路,共包括 12 723 个注释的 Unigene(占全部注释 Unigene 数量的 93.18%),其中,泡泡刺次生代谢物相关的 Unigene 共 3 269 个(占注释全部 Unigene 数量的 23.94%),这些次生代谢物类型主要包括激素类(681 个)、萜类(428 个)、生物碱(1 350 个)和黄酮类化合物(186 个)。黄酮类化合物代谢包括类黄酮代谢(141 个)、黄酮和黄酮醇代谢(45 个)。这些 Unigene 序列为以后的白刺遗传

工程研究提供核酸序列信息,也表明高通量测序技术鉴定代谢途径相关基因的实用性。

表 3 泡泡刺转录组 KEGG 分类结果

序号	通路	数量/个	通路编号
1	代谢途径	3 189	ko01100
2	剪接体	834	ko03040
3	植物病原菌互作	811	ko04626
4	植物激素的生物合成	681	ko01070
5	核糖体	632	ko03010
6	苯丙酸的生物合成	547	ko01061
7	萜类和类固醇的合成	428	ko01062
8	莽草酸途径的生物碱合成	378	ko01063
9	鸟氨酸、赖氨酸和烟胺来源的生物碱合成	360	ko01064
10	淀粉和蔗糖代谢	339	ko00500
11	泛素介导的蛋白降解	318	ko04120
12	组氨酸和嘌呤来源的生物碱合成	314	ko01065
13	嘌呤代谢	309	ko00230
14	氧化磷酸化作用	301	ko00190
15	萜类化合物和聚酮来源的生物碱合成	298	ko01066
16	苯丙素的合成	282	ko00940
17	内吞作用	281	ko04144
18	嘧啶代谢	228	ko00240
19	半胱氨酸和蛋氨酸代谢	210	ko00270
20	RNA 降解	210	ko03018
21	糖酵解途径	207	ko00010
22	过氧化物酶体	204	ko04146
23	黄酮类化合物的生物合成	186	ko00941/4
24	昼夜节律	173	ko04712
25	柠檬烯和蒽烯降解	172	ko00903
26	氨基糖和核苷酸糖代谢	170	ko00520
27	芪类化合物及姜辣素的合成	170	ko00945
28	核苷酸切除修复	165	ko03420
29	甘油磷脂代谢	163	ko00564
30	丙酮酸代谢	163	ko00620

## 2.3 泡泡刺转录组中黄酮类生物合成基因发掘

从 KEGG 分析中可看出:获得黄酮类化合物相关合成基因有 186 个,其在代谢通路中的位置及相关基因的数量见图 3 和表 4。本研究从泡泡刺当年生叶中获得了 12 个苯丙氨酸解氨酶(PAL)基因,该基因是初生代谢和苯丙烷代谢途径之间的代谢联系节点。随后,查尔酮合成酶(CHS,2 个)作为第 1 个关键酶,将苯丙烷代谢途径引向黄酮类化合物的合成;同时,获得了 4 个查耳酮异构酶(CHI),该酶催化分子内的环化反应;然后,黄碱酮 3-二加氧酶(F3H,11 个)将 CHI 催化合成的(2S)-黄烷酮或(2S)-5-脱氧黄烷酮的 C-3 位羟基化,生成二氢黄酮醇。另外,本研究获得了 12 个黄酮醇合成酶(FLS),该酶催化黄酮结构中的 C-3 位羟基化,从而形成各种黄酮醇类物质。二氢黄酮醇还原酶(DFR,25 个)是花青素和鞣质合成途径中的关键酶,也是一个重要的分支点。从上述分析可看出,本研究在泡

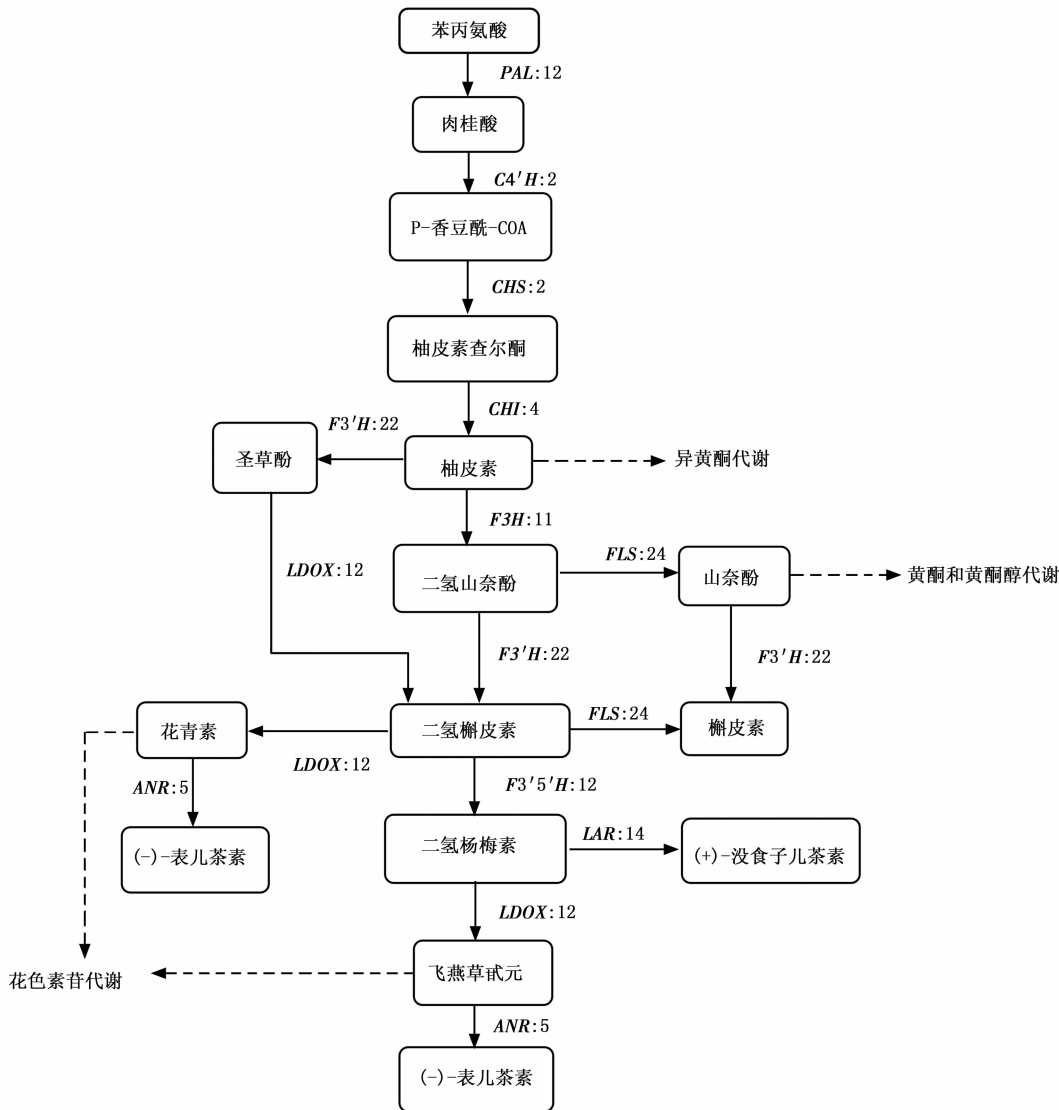


图3 泡泡刺转录组黄酮类化合物合成途径及相关基因(基因名称后的数字表示本研究中从泡泡刺当年生叶获得的该基因数量。)

表4 泡泡刺转录组黄酮类化合物合成途径中的相关基因

基因名称	基因简称	数量/个	EC 编号
莽草/茛氨酸酯转移酶	<i>HCT</i>	33	2.3.1.133
咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶	<i>CCoAOMT</i>	5	2.1.1.104
花青素还原酶	<i>ANR</i>	5	1.3.1.77
类黄酮 3',5'-羟化酶	<i>F3'5'H</i>	12	1.14.13.88
二氢黄酮醇 4-还原酶/黄酮 4-还原酶	<i>DFR</i>	25	1.1.12.34
无色花青素还原酶	<i>LAR</i>	14	1.17.1.3
查尔酮异构化酶	<i>CHI</i>	4	5.5.1.6
黄碱酮 3-二加氧酶	<i>F3H</i>	11	1.14.11.9
查尔酮合酶	<i>CHS</i>	2	2.3.1.74
黄酮醇合成酶	<i>FLS</i>	12	1.14.11.23
无色花色素双加氧酶	<i>LDOX</i>	12	1.14.11.19
类黄酮 3'-单加氧酶	<i>F3'H</i>	22	1.14.13.21
香豆酰奎尼酸 3'-单加氧酶	<i>C3'H</i>	10	1.14.13.36
肉桂酸 3-羟化酶	<i>CAH</i>	2	1.14.13.11

泡泡刺叶中获得了较多的黄酮类代谢相关基因,这些基因将为后续阐明其忍耐极端环境的机制奠定

基础。

### 3 结论与讨论

通过对野外正常降雨与人工增雨条件下泡泡刺当年生叶转录组测序及相关生物信息学分析,共获得 48 921 条 Unigene 序列,平均长度为 454 bp,N50 为 591 bp。这与其他植物转录组测序结果类似,所得到的数据量较大,组装效果也较好,如虎杖 (*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.)<sup>[17]</sup>、中麻黄 (*Ephedra intermedia* Schrenk)<sup>[18]</sup>、膜果麻黄 (*Ephedra przewalskii* Stapf)<sup>[19]</sup>;同时,对注释后的 Unigene 进行 COG、GO 和 KEGG 等分析发现,次生代谢相关基因在该转录组中占有一定的比例;利用 KEGG 通路进一步分析,共获得 186 个黄酮类化合物合成途径的

关键基因。这为后续研究泡泡刺抗逆分子机制及其黄酮类合成途径作用奠定基础。

由于黄酮类化合物合成机制在植物次生代谢领域是十分重要的研究前沿之一,因此,在白刺属植物上已开展了黄酮化合物的提取、分析及化合物结构的研究<sup>[20-21]</sup>,但很少见有关黄酮类代谢途径的研究;然而,在其它非模式物种如麻黄<sup>[18-19]</sup>、茶(*Camellia sinensis* (L.) O. Ktze)<sup>[22]</sup>、罗汉果(*Momordica grosvenori* Swingle)<sup>[23]</sup>等的转录组中已有相关报道,如在罗汉果转录组 KEGG 注释结果中发现黄酮类合成相关基因 45 个<sup>[23]</sup>;而中麻黄转录组 KEGG 注释结果中达 283 个<sup>[18]</sup>。本研究对泡泡刺进行分析发现,黄酮类合成相关基因也达 186 个,这表明沙生植物麻黄和白刺等富含黄酮类物质可能对其适应极端沙漠生境具有极其重要的作用。另外,这些基因包括了大部分该代谢过程中的关键基因,如 *CHS*、*CHI*、*IFS*、*F3H*、*FLS*、*DFR*、*F3'5'H* 和 *FNS* 等(图 3;表 4),为进一步在泡泡刺中克隆其全长,研究其次生代谢调控途径及其在抗逆中的作用奠定基础。如槲皮素及其衍生物在医学上可作为最强的抗癌剂之一<sup>[24]</sup>,那么在植物抗逆中的作用如何? 本研究从极端生境植物泡泡刺中获得了其合成关键基因 *F3'5'H*;另外 *CHS* 催化合成的查尔酮是合成黄酮类化合物的重要中间体,同时具有抗菌活性、抗癌活性等<sup>[25]</sup>。这些基因的获得不仅为黄酮类次生代谢工程研究提供基础,而且对研究其在抗逆中的作用也起到极其重要的作用。

综上所述,本研究获得了较好的泡泡刺转录组数据,初步发掘了其黄酮类化合物的代谢途径相关基因,为克隆该属植物中黄酮合成的关键基因奠定基础,同时为更好的研究其抗逆机制和药用价值以及开发提供宝贵资源。

## 参考文献:

- [1] 潘晓玲,沈观冕,陈鹏. 白刺属植物的分类学及系统学研究[J]. 云南植物研究,1999,21(3):287-295.
- [2] 刘殿君,吴波,李永华,等. 极端干旱区增雨加速泡泡刺群落土壤碳排放[J]. 生态学报,2012,32(17):5396-5404.
- [3] Cheng T, Chen J, Zhang J, et al. Physiological and proteomic analyses of leaves from the halophyte *Tangut Nitraria* reveals diverse response pathways critical for high salinity tolerance[J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 30.
- [4] Li Q Y, Zhao W Z, Fang H Y. Adaptation of *Nitraria sphaerocarpa* to wind-blown sand environments at the edge of a desert oasis[J]. *J Environ Sci (China)*, 2007, 19(4): 482-487.
- [5] Gravel E, Poupon E. Biosynthesis and biomimetic synthesis of alkaloids isolated from plants of the *Nitraria* and *Myrioneuron* genera: an unusual lysine-based metabolism[J]. *Nat Prod Rep*, 2010, 27(1): 32-56.
- [6] Halim A F, Saad H E, Hashish N E. Flavonol glycosides from *Nitraria retusa*[J]. *Phytochemistry*, 1995, 40(1): 349-351.
- [7] Du J, Yan P, Dong Y, et al. Phenological response of *Nitraria tangutorum* to climate change in Minqin County, Gansu Province, Northwest China[J]. *Int J Biometeorol*, 2010, 54(5): 583-593.
- [8] 白潇,李毅,苏世平等. 不同居群唐古特白刺叶片解剖特征对生境的响应研究[J]. 西北植物学报,2013,23(10):1986-1993.
- [9] 张艳艳,刘威,宣亚楠,等. 水杨酸对盐胁迫下唐古特白刺活性氧代谢和细胞膜透性抑制的缓解效应[J]. 东北林业大学学报,2013,41(12):56-59.
- [10] 唐欣,王瑞辉,杨秀艳,等. 唐古特白刺液泡膜  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向运输蛋白基因 *NiNHX1* 的克隆与表达分析[J]. 林业科学,2014,27(3):38-44.
- [11] Chen J, Cheng T, Wang P, et al. Salinity-induced changes in protein expression in the halophytic plant *Nitraria sphaerocarpa*[J]. *J Proteomics*, 2012, 75(17): 5226-5243.
- [12] Saija A, Scalese M, Lanza M, et al. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes[J]. *Free Radic Biol Med*, 1995, 19(4): 481-486.
- [13] Cheynier V, Comte G, Davies K M, et al. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2013, 72:1-20.
- [14] 文海涛,赵红英,肖霞霞,等. 化州柚查尔酮合成酶基因克隆与序列分析[J]. 生物学报,2011,28(1):39-41.
- [15] Shimada N. 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*[J]. *Plant Physiol*, 2003, 131(3): 941-951.
- [16] 张丹凤. 蒙古黄芪异黄酮合成酶基因的克隆及序列分析[D]. 福州:福建农林大学,2004.
- [17] 郝大程,马培,穆军,等. 中药植物虎杖根的高通量转录组测序及转录组特性分析[J]. 中国科学:生命科学,2012,42(5):398-412.
- [18] 邓楠,史胜青,常二梅,等. 基于中麻黄萌发种子转录组的黄酮类化合物合成途径基因的挖掘[J]. 林业科学研究,2014, 27(6):758-763.
- [19] 邓楠,史胜青,常二梅,等. 膜果麻黄种子不同发育时期的转录组测序分析[J]. 东北林业大学学报,2015,43(2):28-32.
- [20] 王洪伦,李玉林,索有瑞. 白刺种子黄酮类化合物最佳提取工艺研究[J]. 食品科学,2004,25(7):97-99.
- [21] 高喆,王佳,特布沁,等. 唐古特白刺叶和茎黄酮含量分析[J]. 中国草地学报,2014,36(3):116-120.
- [22] Shi C Y, Yang H, Wei C L, et al. Deep sequencing of the *Camellia sinensis* transcriptome revealed candidate genes for major metabolic pathways of tea-specific compounds[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 131.
- [23] Tang Q, Ma X, Mo C, et al. An efficient approach to finding *Siraitia grosvenorii* triterpene biosynthetic genes by RNA-seq and digital gene expression analysis[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 343.
- [24] 王晓梅,曹稳根. 黄酮类化合物药理作用的研究进展[J]. 宿州学院学报,2008,22(1):105-107.
- [25] 廖头根,汪秋安,方伟琴,等. 新型查尔酮类化合物的合成及其生物活性研究[J]. 有机化学,2006,26(5):685-689.

(责任编辑:詹春梅)