

doi:10.3969/j.issn.1006-9690.2021.10.001

三江源地区灌木亚菊的转录组分析

徐浩^{1,2}, 夏铭泽^{1,2}, 张发起^{1*}

(1. 中国科学院高原生物适应与进化重点实验室, 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001; 2. 中国科学院大学 生命科学学院, 北京 100039)

摘要 灌木亚菊广泛分布于我国西北地区, 具有止咳化痰、镇痛消炎、活血化瘀等显著功效。为了研究灌木亚菊叶片中功能基因的表达情况, 利用 Illumina 高通量测序技术对三江源地区的灌木亚菊进行转录组分析, 预测得到 53 760 条 Unigenes。经分析发现与药用活性相关的基因主要富集在甾体、黄酮类、苯丙素类及萜类化合物部分; 代谢通路分析中得到 233 条 Unigenes 与药用活性相关的次生代谢通路, 主要涉及具有镇痛消炎的苯丙素类、萜类化合物等成分。此外还检测出 SSR 位点 4 586 个及 SNP 多态性位点 42 013 个。本研究为灌木亚菊的资源利用和保护、遗传多样性等研究提供了基础数据。

关键词 灌木亚菊; 转录组分析; 代谢通路; 三江源地区

中图分类号: Q949.785.3

文献标识码: A

文章编号: 1006-9690(2021)10-0001-08

Transcriptome Analysis for *Ajania fruticulosa* from Sanjiangyuan Area

Xu Hao^{1,2}, Xia Mingze^{1,2}, Zhang Faqi^{1*}

(1. Key Lab. of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; 2. College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract *Ajania fruticulosa* is widely distributed in the northwest region of China, which has the effects of relieving cough and phlegm, relieving pain and inflammation, promoting blood circulation, and removing blood stasis. In this study, the transcriptomes of *A. fruticulosa* were sequenced by the platform of Illumina, aiming at studying its expression of functional genes, and 53 760 Unigenes were annotated. The analysis showed that the genes related to medicinal activities were mainly enriched in steroids, flavonoids, phenylpropanoids, and terpenoids. 233 Unigenes were identified to relate to medicinal constituents by pathway analysis, mainly involving phenylpropanoids and terpenoids with analgesic and anti-inflammatory properties. In addition, 4 586 SSR loci and 42 013 SNP polymorphisms were predicted. The current study provides a basis for utilization, conservation and genetic diversity of *A. fruticulosa*.

Key words *Ajania fruticulosa*; Transcriptome analysis; Metabolic pathway systems; Sanjiangyuan

灌木亚菊(*Ajania fruticulosa* (Ledeb.) Poljak) 隶属菊科(Asteraceae)亚菊属(*Ajania*), 小亚灌木, 主要分布于我国西北地区及俄罗斯中亚地区 550~4 400 m 的荒漠及荒漠草原^[1]。灌木亚菊在青藏高原地区资源量丰富, 全草入药, 有止咳止血、排毒消炎、镇定、祛痰及抗蛔虫等药效, 还可用于活血化瘀、咽喉肿痛等疾病^[2]。该植物具纵深发达的根, 且蒸腾作用

较弱, 使得灌木亚菊的抗旱能力较强, 广布于干旱和半干旱的荒漠地带^[3]。此外, 因其适口性好, 可作为牛、羊等牲畜的食料^[4]。目前亚菊属植物的研究主要集中在化学成分及其药理学方面, 如 Li 等^[5]以灌木亚地上部分为原料提取出两种新的愈创木内酯和四种黄酮类化合物, 对黄嘌呤氧化酶有较好的抑制作用。张占欣^[6]通过亚菊属植物细叶亚菊(*A.*

收稿日期: 2021-01-15, 录用日期: 2021-09-18

基金项目: 第二次青藏高原综合科学考察研究(2019QZKK0502)。

作者简介: 徐浩(1997-), 男, 山东淄博人, 博士研究生, 研究方向为高山植物多样性。E-mail: xuhao20@mailsucas.ac.cn

*通讯作者: 张发起(1983-), 男, 山东泰安人, 博士, 副研究员, 研究方向为高山植物多样性。E-mail: fqzhang@nwpb.cas.cn

tenuifolia)的全草提取到了以萜类、黄酮及香豆素为主的35个化合物。Liu等^[7]对细裂亚菊(*A. przewalskii*)精油研究发现其具有一定的抗菌活性。Shi等^[8]在柳叶亚菊(*A. salicifolia*)中分离得到了47种次生代谢产物,以此来探讨它们在亚菊属中的化学分类学意义。此外,通过研究亚菊属植物(*A. shiwogiku* var. *kinokuniense*)内抗氧化酶对锈病的抗性来证明其对锈病的抗性机制^[9]。通过测定同科植物菊花(*Chrysanthemum morifolium*)及其炮制品中绿原酸、木犀草苷等药用成分的含量,提供炮制品合适的质量控制参考方法^[10]。然而该属的分子生物学研究涉及较少,仅有少数基于高通量测序获取叶绿体基因组开展系统发育分析等研究工作^[11],而在转录组与基因组方面的研究接近空白。

近年来,基因组学、转录组学、蛋白组学、代谢组学等组学技术的发展突飞猛进,特别是以转录组等功能基因组学在植物分子生物学研究中的应用越来越广泛^[12-13]。对接链格孢菌(*Alternaria tenuissima*)的菊花(*C. morifolium*)叶片进行转录组分析,观察到病原体识别、细胞壁修饰等差异转录的基因在病原体侵入后被上调^[14]。油料作物红花(*Carthamus tinctorius*)的转录组分析成功预测出黄酮类化合物和种子油脂生物合成的相关基因^[15]。低温诱导的灰白银胶菊(*Parthenium argentatum*)表皮组织转录组研究发现天然橡胶的生物合成与夜间低温相关^[16]。

青藏高原地区的灌木亚菊资源量巨大,有着巨大的开发潜力,且其主要分布在荒漠区,也具有重要的生态价值。然而,目前对该植物的研究涉及还较少,尤其在灌木亚菊的药理作用、功能成分及作用机理研究较少^[4]。因此,本研究利用Illumina Hiseq™测序平台对灌木亚菊叶片进行转录组测序、组装和生物信息学分析,挖掘药用活性相关基因及代谢通路,并对其分子标记进行预测分析,为灌木亚菊的资源利用和保护、遗传多样性等研究提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

灌木亚菊新鲜、健康的叶片于夏季(7月初,植物花期)采集于青海省海南州共和县(地理坐标N36°10'53",E100°59'14";海拔2 835 m)。分别采集3株植物的叶片经75%乙醇和超纯水处理后迅速置于液氮,带回实验室后置于-80℃的超低温冰箱下保

存备用。凭证标本(凭证标本号:zhang2018023)保存于中国科学院西北高原生物研究所青藏高原生物标本馆(HNWP)。

1.2 试验方法

1.2.1 灌木亚菊RNA的提取与文库构建

利用Total RNA Extractor(Trizol)提取试剂盒提取灌木亚菊叶片(3株植物的叶片混样)中总RNA,并用琼脂糖凝胶电泳与Nanodrop 2000检测总RNA的浓度与纯度。检测合格的RNA参照生工生物工程(上海)股份有限公司的标准流程进行文库构建。文库构建完成后,采用Qubit 2.0、Agilent 2100进行文库质量检测,并使用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),以保证文库质量。

1.2.2 序列的测序及拼接

基于Illumina Hiseq™高通量测序平台进行测序,经CASAVA碱基识别(Base calling)把数据文件转换为原始测序序列(Raw reads)。利用FastQC v0.11.2^[17]对原始数据进行质量评估,Trimmomatic v0.36(<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>)对含有带接头的、低质量的序列进行数据质控,得到高质量的序列(Clean reads)。最后使用Trinity v2.4.0^[18]将Clean reads进行从头组装,得到的转录本去冗余后,将每个转录本聚类中长度最长的作为Unigenes用于后续分析。

1.2.3 基因的功能注释

为获得全面的基因功能信息,通过NCBI Blast+v2.60^[19]将Unigenes与CDD、KOG、NR、NT、PFAM、Swissprot、TrEMBL、GO、KEGG等数据库比对。根据Swissprot、TrEMBL的蛋白注释结果得到GO功能注释信息。利用KAAS v2.1^[20]将Unigenes与KEGG数据库比对进行代谢通路分析。根据转录本与数据库Blast的比对结果通过软件TransDecoder v3.0.1进行编码序列(Coding sequence, CDS)预测。

1.2.4 SSR与SNP的预测

基于组装好的转录本Unigenes序列,利用工具MISA v1.0^[21]来识别Unigenes中的简单重复序列(Simple sequence repeat, SSR),其中一至六重复单元SSR的至少重复次数依次为:10、6、5、5、5、5次。结果包含复合型与完美型SSR,BCFtools v1.5^[22](参数设置:质量值>20,覆盖度>8)抽提Unigenes中的单核苷酸多态性SNP(Single nucleotide polymorphisms, SNP)进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 转录组测序数据分析

经琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的产量与质量胶图如图 1 所示(本研究样品编号为 23,其中 Marker 为 DNA Marker,其只为检测基因组污染,并不代表 RNA 条带大小),检测合格后的样本再进行后续转录组分析。灌木亚菊转录组共得到 Raw reads 47 084 098 条(平均长度为 150 bp),质控后 Clean reads 45 983 774 条,平均长度为 145 bp,平均 GC 含量 46.13%,Q30(碱基质量在 30 以上的序列)的序列占 95.01%,表明测序所得序列质量能够满足后续分析。

基于 Trinity 从头测序组装和拼接共获得 103 820 个 Transcripts,其中挑选最长的转录本共得到 53 760 条 Unigenes, N50 长度为 1 155 bp(表 1)。对 Unigenes 的长度进行统计(图 2),200~300 nt 之间数量最多,有 19 461 条,占比 36.20%;300 nt~2 000 nt 之间的有 31 158 条,占比 57.96%;大于 2 000 nt 的

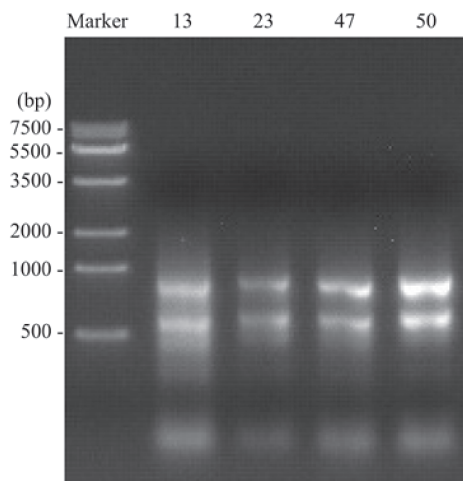


图 1 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA

序列共有 3 141 条,占比 5.84%。其中,共有 38 215 条 Unigenes 可作为 CDS 序列,长度在 200~300 nt 之间的 CDS 序列占比最多(25.20%),与 Unigenes 长度的分布趋势大体一致(图 3)。

表 1 灌木亚菊转录组数据拼接结果

Table 1 Assembly result of transcriptome data from *A. fruticulose*

(单位:bp)

数据类型	数量	≥500	≥1000	N50	N90	最大长度	最小长度	总长	平均长度
Transcript	10 3820	54 859	29 743	1 263	339	9 698	201	84 844 603	817.23
Unigene	53 760	22 452	11 977	1 155	273	9 698	201	37 670 027	700.71

2.2 灌木亚菊 Unigenes 的功能注释

将从头组装的 Unigenes 共 53 760 条分别与 CDD、KOG、NR、NT、PFAM、Swissprot、TrEMBL、GO、KEGG 数据库进行比对,发现至少注释到一个数据库的 Unigenes 数量为 33 766(62.81%)条,有 2 142 条 Unigenes 在 9 个数据库中都能匹配成功,但仍有 19 994 条未能与上述数据库成功匹配(表 2)。将 Unigenes 与 NR 数据库比对,共获得注释信息 32 505 条。与灌木亚菊 Unigenes 的 NR 注释匹配数最多的十个物种中,同科多年生草本植物洋蓟(*Cynara cardunculus* var. *scolymus*)与灌木亚菊的 Unigenes 相关序列最多,共 18 898 条(占比 58.14%),剩余物种匹配度不高且与灌木亚菊亲缘关系较远(图 4)。

2.3 GO 数据库功能分类注释

基于 Swissprot 和 TrEMBL 两种数据库的蛋白注释结果,根据 Uniprot 所得注释信息得到 Unigenes 的 GO 注释,共有 27 892 条 Unigenes 被注释,获得 171 904 条注释信息,分属于细胞组分(Cellular component)、分子功能(Molecular function)以及生物学

过程(Biological process)三大类(图 5)。在与药用成分相关基因注释中,涉及甾体(366 条)与黄酮类化合物(204 条)的居多,分别归属于生物学过程及分子功能类。苯丙素类主要涉及苯丙素的生物合成及代谢,有 68 条信息被注释出,而中草药中常见的萜类化合物也有 48 条信息被注释。

2.4 KEGG 数据库的代谢通路分析

为了解灌木亚菊基因所参与的代谢途径,将 Unigenes 序列与 KEGG 数据库比对分析,共 3 619 条 Unigenes 获得注释,包含有 5 892 个注释信息,共归为细胞进程、环境信息处理、遗传信息处理、新陈代谢、有机体系统五大类(图 6)。

为了解灌木亚菊化学成分的相关信息,筛选出了包含主要药用活性成分的相关通路(表 3)。通路涉及苯丙素类、黄酮类、醌类、生物碱类、萜类、有机酸及酚类这些常见药用活性成分。在萜类化合物的生物合成途径中,倍半萜合成通路较为显著,其主要是由焦磷酸金合欢酯衍生而成,多以五元内酯环的形式存在,是亚菊属植物中特有的萜类成分。

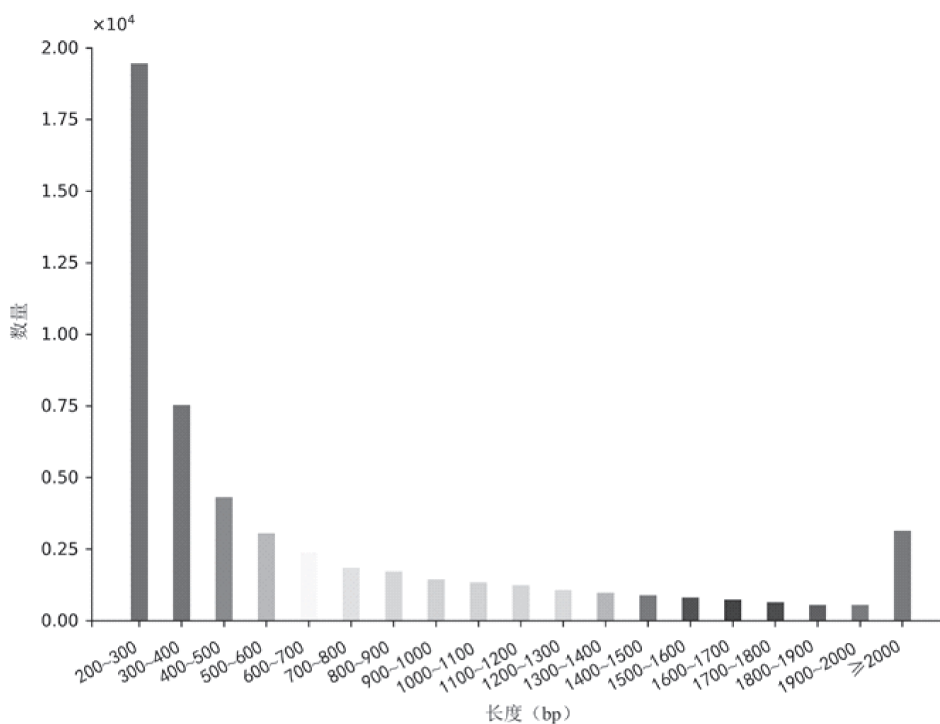


图2 灌木亚菊 Unigenes 的长度分布图

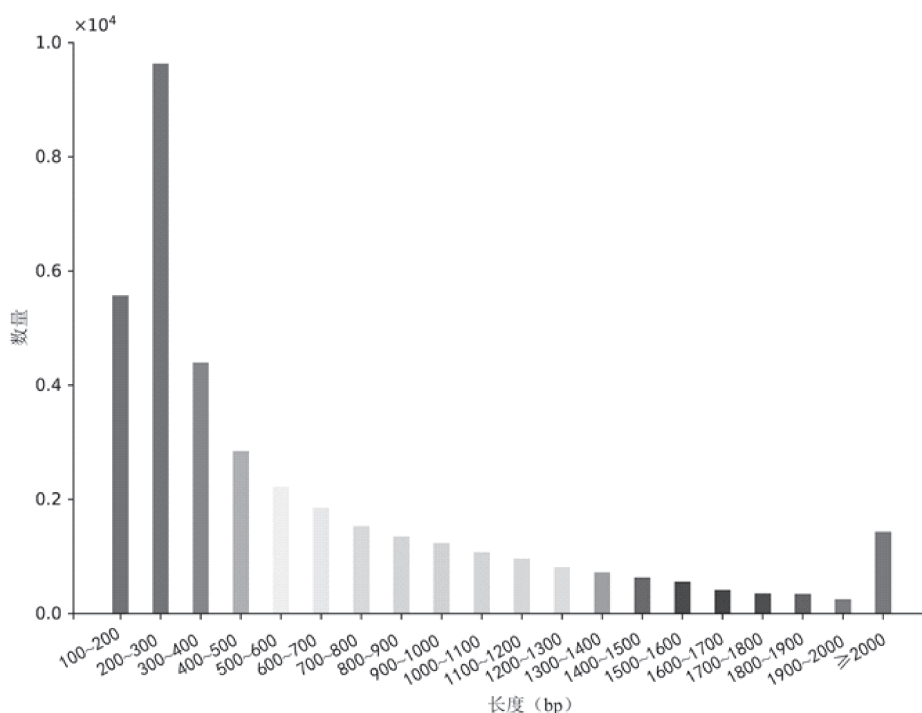
Fig. 2 Length distruption of *A. fruticulose* Unigenes

图3 灌木亚菊 CDS 的长度分布图

Fig. 3 Length distruption of *A. fruticulose* CDS

黄酮类化合物也是重要的药用活性成分,且涉及该通路基因的表达比重上升,它通过抑制酪氨酸酶的活性而具有显著的抗氧化能力。此外,反式肉桂酸

等芳香族衍生物表达量的上升促进了苯丙素类生物合成的化学反应;通过接受呼吸链电子传递的脂溶性辅酶促进泛醌及其衍生物的合成。

表 2 灌木亚菊转录组注释结果

Table 2 The results of transcriptome annotation of *A. fruticulose*

数据库	Unigenes 数量	百分比(%)
注释到 CDD	19 314	35.93
注释到 KOG	14 741	27.42
注释到 NR	32 505	60.46
注释到 NT	14 552	27.07
注释到 PFAM	14 080	26.19
注释到 Swissprot	24 369	45.33
注释到 TrEMBL	32 441	60.34
注释到 GO	27 892	51.88
注释到 KEGG	3 619	6.73
至少注释到一个数据库	33 766	62.81
注释到所有数据库	2 142	3.98
Unigenes 总数	53 760	100

2.5 灌木亚菊转录组的 SSR 及 SNP 分析

灌木亚菊转录组共鉴定出 6 种 SSR 重复类型, 不同类型简单重复序列出现的数量差距显著, 其中单、二和三碱基重复的数量要远高于其他类型。单核苷酸多态性分析共获得 42 013 个 SNP 位点, 4 470 个 InDels, 转换和颠换所发生的比率近似 2: 1(图 7)。

3 结论与讨论

灌木亚菊广泛分布于我国西北地区及俄罗斯中亚地区, 被用于治疗阑尾炎、肺结核、肺气肿等疾病^[23]。灌木亚菊多作为提取倍半萜和酚类等药用化学组分的主要原料^[24-25]。为了解灌木亚菊药用次级代谢产物的代谢途径, 本研究对灌木亚菊进行了

转录组测序及分析, 旨在挖掘药用成分的相关功能基因, 为亚菊属植物的资源利用及保护提供基础数据。植物基因组结构复杂和倍性变化等导致其基因组学研究进展缓慢。而转录组可以精确反映植物在特定时空状态下的基因表达, 能够在不同的组织器官、发育阶段和生理状态下, 发现植物基因的差异性表达^[27-28]。

对灌木亚菊转录本进行测序、质控、拼接共获得 53 760 条 Unigenes, N50 长度为 1 155 bp, 平均长度为 817.23 bp, 与巴哈雀稗(*Paspalum notatum*)^[29]、光皮树(*Swida wilsoniana*)^[30]、万寿菊(*Tagetes erecta*)^[31]、滨麦(*Leymus mollis*)^[32]、碰碰香(*Plectranthus tomentosus*)^[33]等物种的转录本在同一水平, 表明本研究所得拼接序列 Unigenes 能够满足转录组生物信息学分析的要求。

约有 1/3 (19 994 条) 的灌木亚菊 Unigenes 在与 CDD 等主要数据库比对中未获得注释。在云南松(*Pinus yunnanensis*)^[34]、多穗柯(*Lithocarpus polystachyus*)^[35]、云锦杜鹃(*Rhododendron fortunei*)^[36]等植物的研究中也类似结果。这可能由于其近缘属植物的转录本测序研究相对较少, 数据库中没有足够相似的序列与之匹配, 也可能是灌木亚菊本身的特异性较高所导致, 这需要对其近缘类群开展进一步的研究。NR 注释中, 多年生草本植物洋蓟(*Cynara cardunculus* var. *scolymus*)与灌木亚菊的相似序列最多, 洋蓟与灌木亚菊同为菊科植物, 其亲缘关系较近, 且二者均分布于干旱的荒漠环境中^[1]。与灌木亚菊相类似, 洋蓟的次生代谢产物主要有酚酸、类黄酮、倍半萜等, 具备抗菌、抗氧化、抗癌等特

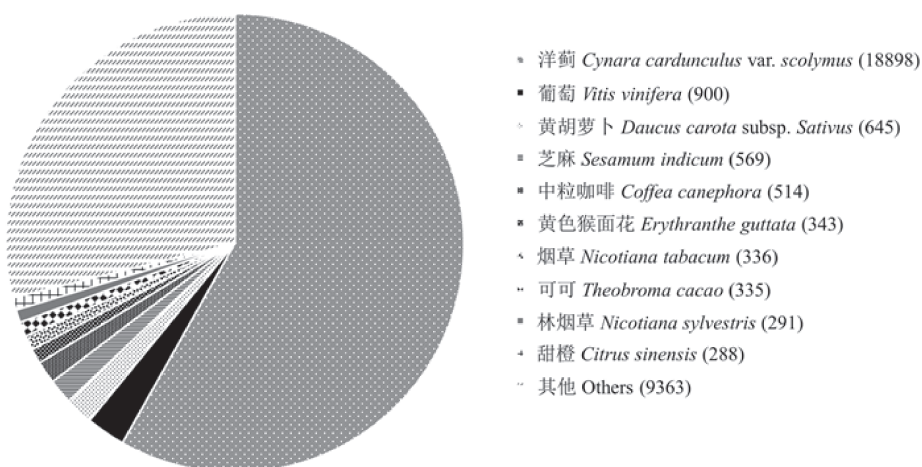


图 4 灌木亚菊 NR 库的物种分布

Fig. 4 Species distribution of *A. fruticulosa* in NR database

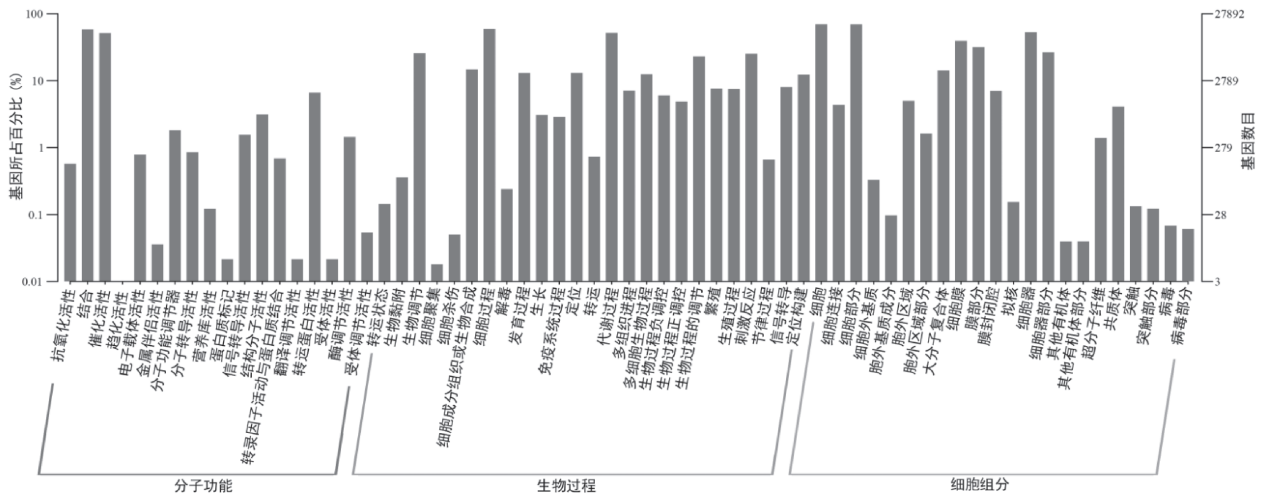


图5 灌木亚菊 Unigenes 的GO功能分类统计图

Fig. 5 GO functional classification statistics diagram of *A. fruticulose* Unigene

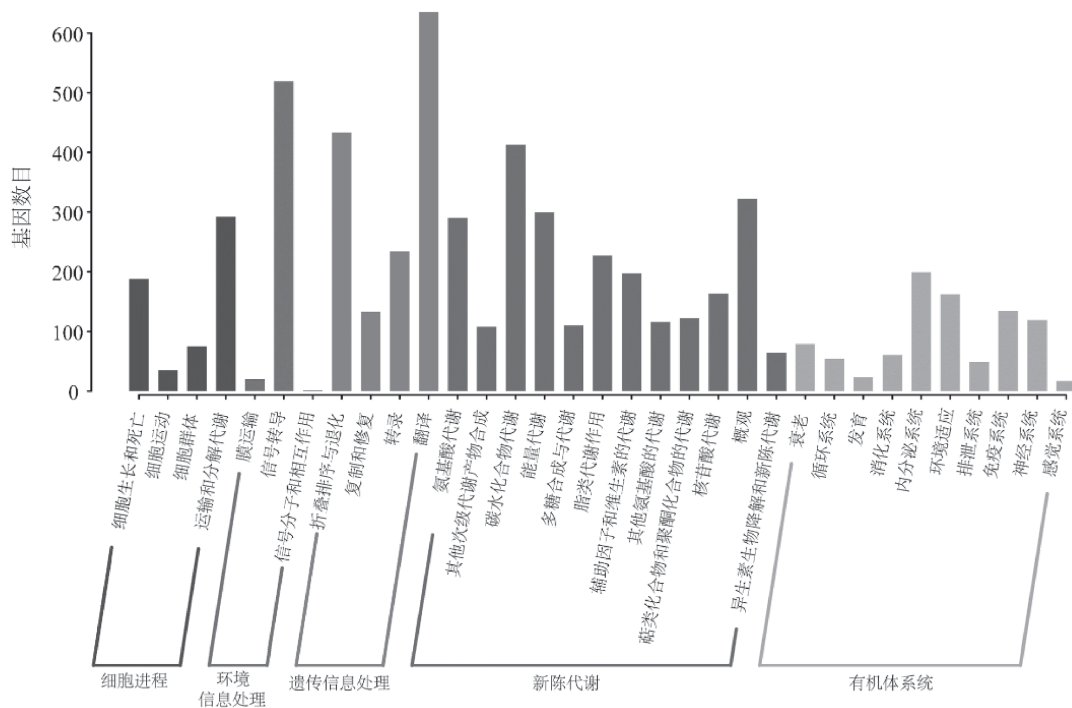


图6 灌木亚菊 Unigenes 的KEGG代谢通路分析

Fig. 6 Metabolic pathways analysis of *A. fruticulose* Unigenes in KEGG database

性^[37]。通过与GO数据库进行功能分类注释,获得与灌木亚菊药用成分相关的基因主要富集于甾体、黄酮类、苯丙素类和萜类化合物,涉及次级产物的生物合成和代谢调控过程,基因富集提供了这些化合物合成途径的线索。

通过KEGG数据库进行代谢通路分析得到与灌木亚菊药用活性相关的代谢通路百余条,如萜类、黄酮类、苯丙素类等。这些代谢通路与灌木亚菊药效,如抗炎^[38]、抗氧化作用^[39]、抗菌抗氧化^[40-41]等密切相关^[42]。苍术(*Atractylodes lancea*)转录组分析发

现萜类骨架和倍半萜主要经甲羟戊酸途径进行生物合成,并且在干旱胁迫下倍半萜的合成通路下调^[43]。灌木亚菊的倍半萜合成通路的数目相比较少,可能是因为灌木亚菊对荒漠及荒漠草原干旱环境的适应从而导致倍半萜合成通路依赖性降低。紫菀属植物(*Aster spathulifolius*)转录组分析发现该植物在抗脂肪生成、抗高血脂等方面的功效主要与其高表达的苯丙素途径密切相关^[44],而本研究的分析结果与之一致,表明灌木亚菊植物在抗脂肪生成、抗高血脂等方面可能也有一定应用潜力。但是

表 3 灌木亚菊药用活性成分代谢通路分析

Table 3 Metabolic pathway of active components of *A. fruticulose*

代谢通路	数量	药效成分	代谢通路编号
苯丙素类生物合成	61	苯丙素类	ko00940
黄酮类生物合成	22	黄酮类	ko00941
黄酮和黄酮醇的生物合成	2	黄酮类	ko00944
聚酮化合物糖单元生物合成	1	聚酮类	ko00523
泛醌和其他萜类化合物-醌生物合成	28	醌类	ko00130
咖啡因代谢	2	生物碱类	ko00232
异喹啉生物碱生物合成	10	生物碱类	ko00950
吲哚生物碱生物合成	1	生物碱类	ko00901
二苯乙烯类、二芳基庚烷类和姜辣素生物合成	16	生物碱类	ko00945
硫代葡萄糖苷生物合成	2	糖苷类	ko00966
萜类骨架生物合成	49	萜类	ko00900
二萜类生物合成	10	萜类	ko00904
倍半萜和三萜类生物合成	7	萜类	ko00909
单萜类生物合成	7	萜类	ko00902
花生四烯酸代谢	15	有机酸及酚类	ko00590

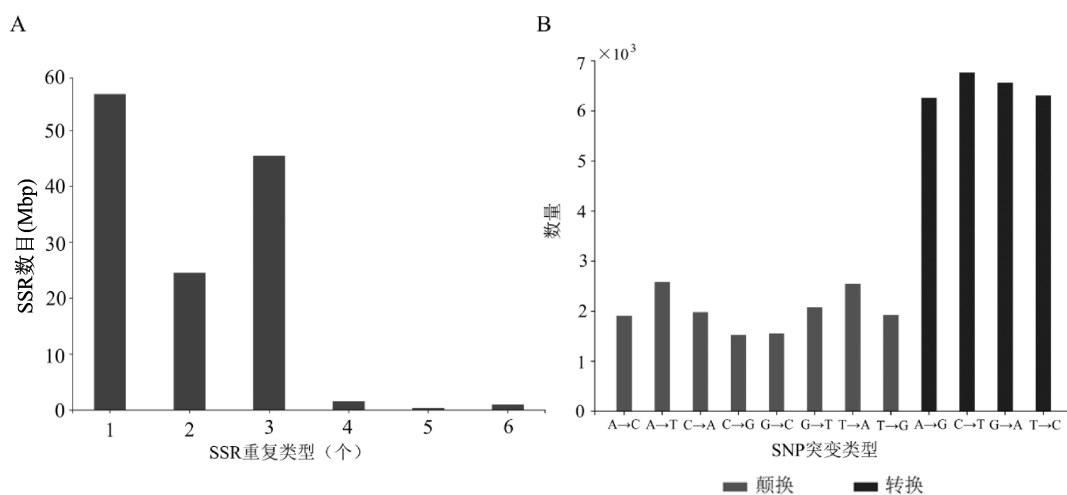


图 7 灌木亚菊 Unigenes 的 SSR (A) 和 SNP 突变类型 (B) 分布

Fig. 7 Distribution of SSR (A) and SNP mutation type (B) of *A. fruticulose* Unigenes

仍需要对灌木亚菊开展进一步的研究,尤其是次级产物的药效方面,如抗菌消炎、止痛止血等,以确定灌木亚菊的药物效能。

此外,在灌木亚菊转录本中鉴定的 SSR 要以单碱基、三碱基、二碱基重复序列较多,与怀菊 (*Chrysanthemum morifolium*)^[45]、药用植物半枫荷 (*Semiliquidambar cathayensis*)^[46]、长梗秦艽 (*Gentiana waltonii*) 和粗梗秦艽 (*Gentiana robusta*)^[47] 的结果相近。分子标记能够反映基因座的遗传多态性,为绘制高密度的遗传图谱提供了可能,为今后灌木亚菊的资源保护及遗传多样性研究提供了一系列的有效工具。

本研究通过高通量测序获得了三江源地区灌

木亚菊转录组,预测得到 53 760 条 Unigenes,通过生物信息学分析获得了丰富的功能基因、代谢通路、分子标记等基础数据,发现与药用活性相关的基因主要富集在甾体、黄酮类、苯丙素类及萜类化合物。KEGG 代谢通路分析中得到 233 条 Unigenes 与药用活性相关的次生代谢通路,主要涉及具有镇痛消炎的苯丙素类、萜类化合物等成分。此外还检测出 SSR 位点 4 586 个及 SNP 多态性位点 42 013 个,为灌木亚菊的资源利用和保护、遗传多样性等研究提供了基础数据。

参考文献:

- [1] 林谔,林有润. 中国植物志第 76(2)卷[M]. 北京: 科学出版社, 1991: 123-124.

- [2] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志[M]. 西宁: 青海人民出版社出版, 1991: 232-233.
- [3] Meng J C, Hu Y F, Chen J H, et al. Antifungal highly oxygenated guaianolides and other constituents from *Ajania fruticulosa* [J]. *Phytochemistry*, 2001, 58(7): 1141-1145.
- [4] 管国情, 王云, 刘亚婷, 等. 藏药灌木亚菊质量标准研究[J]. *甘肃中医药大学学报*, 2016, 33(2): 55-58.
- [5] Li H, Meng J C, Cheng C, et al. New guaianolides and xanthine oxidase inhibitory flavonols from *Ajania fruticulosa* [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62(7): 1053-1055.
- [6] 张占欣. 三种菊科植物和一种玄参科植物化学成分及其生物活性研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2008: 1-2.
- [7] Liu R K, Yang Y, Wu J, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ajania przewalskii* [J]. *Chem Nat Compd*, 2014, 50(2): 370-372.
- [8] Shi Z N, Wu R H, Pang X Y, et al. Secondary metabolites from *Ajania salicifolia* and their chemotaxonomic significance [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2017, 70(Feb.): 162-167.
- [9] Wang Y J, Zeng J, Xia X L, et al. Comparative analysis of leaf trichomes, epidermal wax and defense enzymes activities in response to *Puccinia horiana* in *Chrysanthemum* and *Ajania* species [J]. *Hortic Plant J*, 2020, 6(3): 191-198.
- [10] 付美霞, 胡伶俐. HPLC法测定菊花及其炮制品中主要成分的含量[J]. *中国野生植物资源*, 2015, 34(1): 26-29.
- [11] Kim H T, Kim J S. The complete chloroplast genome sequence of *Ajania pacifica* (Nakai) Bremer & Humphries [J]. *Mitochondrial DNA Part B*, 2020, 5(3): 2399-2400.
- [12] 王楚彪, 卢万鸿, 林彦, 等. 转录组测序的发展和应用[J]. *桉树科技*, 2018, 35(4): 20-26.
- [13] 张召宝, 侯林, 潘晴, 等. 中药高通量转录组研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(9): 1553-1558.
- [14] Li H Y, Chen S M, Song A P, et al. RNA-Seq derived identification of differential transcription in the chrysanthemum leaf following inoculation with *Alternaria tenuissima* [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 1-14.
- [15] Huang L L, Yang X, Sun P, et al. The first Illumina-based de novo transcriptome sequencing and analysis of safflower flowers [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38653.
- [16] Ponciano G, McMahan C M, Xie W S, et al. Transcriptome and gene expression analysis in cold-acclimated guayule (*Parthenium argentatum*) rubber-producing tissue [J]. *Phytochemistry*, 2012, 79(7): 57-66.
- [17] Andrews, S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data [EB/OL]. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. html, 2010-04-26.
- [18] Haas B J, Papanicolaou A, Yassour M, et al. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis [J]. *Nat Protoc*, 2013, 8(8): 1494-1512.
- [19] Altschul S F, Madden T L, Schäffer A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(17): 3389-3402.
- [20] Moriya Y, Itoh M, Okuda S, et al. KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(suppl 2): W182-W185.
- [21] Thiel T, Michalek W, Varshney R, et al. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 106(3): 411-422.
- [22] Li H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2987-2993.
- [23] 罗建军, 曾涌, 陈卫琼, 等. 亚菊属植物化学成分和药理活性研究进展[J]. *中药材*, 2014, 37(12): 2304-2311.
- [24] Wang W Z, Tan R X, Yao Y M, et al. Sesquiterpene lactones from *Ajania fruticulosa* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 37(5): 1347-1349.
- [25] Meng J C, Tan R X. Ajanoside, a xanthine oxidase inhibitor with a novel skeleton from *Ajania fruticulosa* [J]. *Chem Lett*, 2000, 29(12): 1418-1419.
- [26] 赵雪艳, 王琪, 杨莎, 等. 药用植物罗布麻的转录组测序及分析[J]. *分子植物育种*, 2020, 18(8): 2503-2511.
- [27] Zhang W J, Xu H Y, Duan X X, et al. Characterizing the leaf transcriptome of *Chrysanthemum rhombifolium* (Ling et C. Shih), a drought resistant, endemic plant from China [J]. *Front Genet*, 2021, 12(2): 625985.
- [28] Xu X X, Zhang S R, Cheng Z, et al. Transcriptome analysis revealed cadmium accumulation mechanisms in hyperaccumulator *Siegesbeckia orientalis* L. [J]. *Environ Sci Pollut Res*, 2020, 27(15): 18853-18865.
- [29] 张宇君, 尚以顺, 王普昶, 等. 巴哈雀稗幼苗叶片转录组分析[J]. *湖南农业科学*, 2019(10): 1-7.
- [30] 周宵, 彭映辉, 陈景震, 等. 木本油料植物光皮树叶片转录组测序与分析[J]. *分子植物育种*, 2020, 18(19): 6305-6313.
- [31] 冯国栋. 万寿菊转录组分析及类胡萝卜素合成途径分子机制研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2019: 30-35.
- [32] 李红婷, 魏露阳, 李中虎, 等. 滨麦叶片转录组分析[J]. *麦类作物学报*, 2018, 38(9): 1084-1093.
- [33] 姜福星, 杨丽娟, 高素萍, 等. 碰碰香叶片的转录组测序分析[J]. *分子植物育种*, 2015, 13(10): 2310-2319.
- [34] 蔡年辉, 邓丽丽, 许玉兰, 等. 基于高通量测序的云南松转录组分析[J]. *植物研究*, 2016, 36(1): 75-83.
- [35] 宋菊, 黄剑, 李志栋, 等. 多穗柯转录组分析及黄酮类化合物合成相关基因的挖掘[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(4): 675-679.
- [36] 许蔷薇, 楼雄珍, 杨彬, 等. 云锦杜鹃转录组分析[J]. *浙江农林大学学报*, 2019, 36(6): 1190-1198.
- [37] Stumpf B, Künne M, Ma L, et al. Optimization of the extraction procedure for the determination of phenolic acids and flavonoids in the leaves of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.) [J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2020, 177(1): 112879.

(下转第24页)

- [13] Bulpitt C J, Li Y, Bulpitt P F, et al. The use of orchids in Chinese medicine [J]. *J Roy Soc Med*, 2007, 100(12): 558-563.
- [14] 斯金平, 张媛, 罗毅波, 等. 石斛与铁皮石斛关系的本草考证 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(10): 2001-2005.
- [15] 罗宇琴, 肖苏萍, 赵润怀, 等. 霍山石斛与铁皮石斛对比研究进展 [J]. *中国现代中药*, 2016, 18(8): 1067-1070, 1080.
- [16] Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows - Wheeler transform [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(14): 1754-1760.
- [17] Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows - Wheeler transform [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(5): 589-595.
- [18] Zhang G Q, Xu Q, Bian C, et al. The *Dendrobium catenatum* Lindl. genome sequence provides insights into polysaccharide synthesis, floral development and adaptive evolution [J]. *Sci Rep*, 2016(6): 19029.
- [19] McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. The genome analysis toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data [J]. *Genome Res*, 2010, 20(9): 1297-1303.
- [20] Alexander D H, Novembre J, Lange K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals [J]. *Genome Res*, 2009, 19(9): 1655-1664.
- [21] Vilella A J, Severin J, Ureta-Vidal A, et al. EnsemblCompara GeneTrees: Complete, duplication-aware phylogenetic trees in vertebrates [J]. *Genome Res*, 2009, 19(2): 327-335.
- [22] Yang J, Lee S H, Goddard M E, et al. GCTA: a tool for genome-wide complex trait analysis [J]. *Am J Hum Genet*, 2011, 88(1): 76-82.
- [23] 邓辉, 陈乃富, 李耀亭, 等. 霍山产3种药用石斛及其杂交优势种的 ISSR-PCR 分子标记鉴别 [J]. *种子*, 2009, 28(2): 43-45.
- [24] 刘明珍, 陈乃富, 刘秀珍, 等. 道地药材霍山石斛及其相似种的分子鉴定 [J]. *生物学杂志*, 2009, 26(05): 34-36.
- [25] 樊洪泓, 李廷春, 邱婧, 等. 石斛属几种植物遗传关系的 SRAP 和 RAPD 比较分析 [J]. *中草药*, 2010, 41(4): 627-632.
- [26] 陆安静, 曾瑶, 杜艺玫, 等. 三种细茎类石斛药材的分子生物学鉴别 [J]. *遵义医科大学学报*, 2020, 43(4): 452-456.
- [27] 李国良, 张建霞, 曾宋君, 等. 基于 ITS、Nad intron2 和 psbA-trnH 序列探讨霍山石斛的分类位置 [J]. *广东农业科学*, 2013(13): 145-147, 168.
- [28] Hou B W, Tian M, Luo J, et al. Genetic diversity assessment and ex situ conservation strategy of the endangered *Dendrobium officinale* (Orchidaceae) using new trinucleotide microsatellite markers [J]. *Plant Syst Evol*, 2012(298): 1483-1491.
- [29] 张君毅, 吴永辉, 刘嘉, 等. 利用 TRAP 和 SCAR 标记评价铁皮石斛的遗传多样性与抗寒性 [J]. *植物生理学报*, 2020, 56(4): 743-751.
- [30] 魏丹红, 徐红. 基于简单重复序列间扩增分子标记的金钗石斛遗传多样性研究 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2021, 45(6): 646-655.
- [31] 吴永辉, 张君毅, 司灿, 等. 基于 CDDP 标记铁皮石斛抗性物质筛选与多样性研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(22): 4748-4754.

(上接第8页)

- [38] Adekenov S M, Kulyjasov A T, Raldugin V A, et al. Ajanolide A, a new germacranolide from *Ajania fruticulosa* [J]. *Russ Chem B+*, 1998, 47(1): 169-172.
- [39] Belenovskaya L M, Markova L P, Nadezhina T P, et al. Flavonoids of *Ajania fruticulosa* [J]. *Chem Nat Compd*, 1977, 13(4): 575-576.
- [40] 任刚, 罗仇平, 李文艳, 等. 半边风苯丙素类成分及抑制中性粒细胞呼吸爆发活性研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(14): 80-83.
- [41] 杨九凌, 祝晓玲, 李成文, 等. 咖啡酸及其衍生物咖啡酸苯乙酯药理作用研究进展 [J]. *中国药学杂志*, 2013, 48(8): 577-582.
- [42] Liang J Y, Lu P Y, Ning A Q, et al. Chemical constituents from the aerial parts of *Ajania fruticulosa* [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2020, 92(Oct.): 104124.
- [43] Zhang A Q, Liu M X, Gu W, et al. Effect of drought on photosynthesis, total antioxidant capacity, bioactive component accumulation, and the transcriptome of *Atractylodes lancea* [J]. *BMC Plant Biol*, 2021, 21(1): 293.
- [44] Claude S J, Park S. *Aster spathulifolius* Maxim. a leaf transcriptome provides an overall functional characterization, discovery of SSR marker and phylogeny analysis [J]. *PloS One*, 2020, 15(12): e0244132.
- [45] 邢冰, 董诚明, 魏硕, 等. 怀菊转录组中 SSR 位点信息分析 [J]. *江苏农业科学*, 2020, 48(11): 57-60.
- [46] 叶兴状, 刘丹, 罗佳佳, 等. 濒危珍稀植物半枫荷的转录组分析 [J]. *植物研究*, 2019, 39(2): 276-286.
- [47] 倪梁红, 赵志礼, 吴靳荣, 等. 藏药解吉基原植物转录组及其环烯醚萜苷类生物合成相关基因的探究 [J]. *药学报*, 2019, 54(5): 944-953.