

西藏八角莲与桃儿七根及根茎 SSH 文库的建立

袁芳^{1,2}, 甄梓娟¹, 徐元江¹, 兰小中^{1,2*}

(1 西藏大学 农牧学院, 西藏林芝 860000; 2 西藏大学 农牧学院-西南大学药用植物联合研发中心, 重庆 400715)

摘要:以西藏八角莲(*Dysosma tsayuensis* Ying)和桃儿七[*Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying]为材料, 构建其根及根茎的 SSH 文库, 从中筛选鬼臼类植物属种间与鬼臼毒素生物合成相关的差异表达基因。从文库中随机挑取 201 个阳性克隆测序后得到 183 条 ESTs。去除载体序列和冗余序列, 聚类拼接得到 17 个西藏八角莲的 unique ESTs。经 BLAST 同源比较和功能查寻, 有功能注释的 unique ESTs 共 12 个, 占 70.6%, 所编码的蛋白涉及光合作用、合成代谢、转录调控等功能; 无功能注释和匹配结果的共 5 个, 占 29.4%。该研究成功构建了西藏八角莲和桃儿七 SSH 文库, 为进一步揭示鬼臼毒素生物合成途径及其调控机制奠定了基础。

关键词:西藏八角莲; 桃儿七; SSH 文库; 鬼臼毒素; EST

中图分类号: Q785 文献标志码: A

Construction of Suppression Subtractive Hybridization Library from the Root and Rhizome of *Dysosma tsayuensis* Ying and *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying

YUAN Fang^{1,2}, ZHEN Zijuan¹, XU Yuanjiang¹, LAN Xiaozhong^{1,2*}

(1 Agriculture and Animal Husbandry College, Tibet University, Linzhi, Tibet 860000, China; 2 TAAHC-SWU Medicinal Plants Joint Research and Development Center, Chongqing 400715, China)

Abstract: In order to screening podophyllotoxin biosynthesis related differentially express genes among podophyllin plant species, we constructed a suppression subtractive hybridization (SSH) library from root and rhizome of *Dysosma tsayuensis* Ying and *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying. 201 positive clones randomly picked from the SSH library were sequenced, and then 183 qualified sequence ESTs which represent 17 unique ESTs through pre-processing, assembling, clustering, annotation and functional classification from *Dysosma tsayuensis* were obtained. Among them, 12 unique ESTs which annotated with database were further classified into functional groups including photosynthesis, biosynthetic metabolism, transcriptional regulation, etc, accounted for 70.6%. 5 unique ESTs were non-annotated or did not match any entry in the databases, accounted for 29.4%. These results showed that we successfully constructed a SSH library of *Dysosma tsayuensis* Ying and *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying, which provided a foundation for revealing the podophyllotoxin biosynthetic pathway and its regulation mechanism.

Key words: *Dysosma tsayuensis* Ying; *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying; SSH library; podophyllotoxin; EST

鬼臼类植物隶属于小檗科 (Berberidaceae), 包括八角莲属 (*Dysosma* Woodson)、足叶草 (鬼臼) 属 (*Podophyllum* L.)、桃儿七属 (*Sinopodophyllum* Ying) 和山荷叶属 (*Diphylleia* Michx.)^[1-2]。鬼臼

收稿日期: 2015-12-06; 修改稿收到日期: 2016-02-01

基金项目: 西藏自然基金项目 (2014019); 西藏特色农牧资源研发协同创新中心建设资助项目 (2014-2015)

作者简介: 袁芳 (1983-), 硕士, 讲师, 主要从事药用植物分子生物学研究。E-mail: yfsamantha-06@163.com

* 通信作者: 兰小中, 博士, 教授, 主要从事药用植物资源与开发利用。E-mail: lanxiaozhong@163.com

类植物是一类具有显著生物活性,又具有悠久应用历史的药用植物。中国汉代的《神农本草经》中就有鬼臼的记载,在以后的本草典籍中亦多记载,鬼臼类植物主要用于治疗蛇咬伤、痈疽肿毒、跌打、风湿筋骨痛及气管炎等症^[3-4]。鬼臼类植物的活性成分主要为木脂素类化合物,其中鬼臼毒素具有高效抗肿瘤活性,已作为合成多种抗癌药物的前体物质^[5-10]。

由于过度采挖、生境破坏和植物自身生长缓慢等原因,鬼臼类野生植物资源逐渐枯竭、物种濒危,已难以满足鬼臼毒素生产的需求。人工规范化栽培势在必行,但目前桃儿七、八角莲的栽培刚刚起步,其他来源植物的新资源开发也有待进一步深入^[11-13]。此外,虽然化学全合成技术已经有所突破,但复杂的合成过程、极低的合成效率(约为5.0%),使人工全合成鬼臼毒素目前仍难以实现商业化^[14-15]。近年来基于生物技术的植物代谢工程,为鬼臼毒素替代资源的开发提供了更多途径,如植物细胞或器官培养、生物转化等,但实现药用植物规范化栽培和植物细胞或器官培养生产鬼臼毒素的前提之一,是必须充分阐明鬼臼毒素的生物合成途径及其调控机制。目前,鬼臼毒素生物合成途径尚不十分清楚,对合成途径中的中间产物、酶、限速步骤等仍知之甚少^[16-18]。

就发现与某一性状相关基因的方法来讲,抑制差减杂交(SSH)被认为是一种较为适合的技术,可在转录水平上发现两材料间差异表达的基因。自1996年报道 SSH 的方法以来,已成功应用在多种植物上,发现了多个与表型性状相关的功能基因,并成功揭示了动植物中一些生命活动的分子机理^[19-23]。本研究选用在鬼臼毒素含量上具显著差异的西藏八角莲和桃儿七 2 种鬼臼类植物作为材料,分别提取根及根茎的 mRNA,以西藏八角莲材料的 cDNA 作检测样品,桃儿七材料的 cDNA 作参照样品,构建 SSH 文库,测定和分析文库中的 ESTs 序列从而发现西藏八角莲根及根茎优势表达的基因。以期今后鬼臼毒素合成相关基因的确定、从分子水平上探究鬼臼毒素生物合成机理以及功能基因辅助鬼臼类药用植物品种的选育奠定基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料与处理

供试材料西藏八角莲、桃儿七采自西藏林芝市米林县,为避免不同的遗传背景造成的假阳性,将植株移栽至西藏大学农牧学院藏药材种质资源圃栽

培。于 2014 年 1 月、3 月、5 月、7 月和 9 月分别从植物材料同一单株上采集根及根茎 100 g,置 -80 °C 冰箱保存备用。2 种植物不同月份采集的根及根茎材料,分别等量混合后用于提取 RNA。

1.2 SSH 文库的构建

西藏八角莲和桃儿七的根及根茎总 RNA 的提取,采用 Fruit-mate™ for RNA Purification(TaKaRa 公司)和 RNAiso Plus(TaKaRa 公司)进行。总 RNA 经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测后进行下一步 SSH 文库的构建工作。双链 cDNA 的合成参照 SMARTer™ Pico PCR cDNA Synthesis Kit(Clontech 公司)说明书完成。以西藏八角莲的 cDNA 为检测样品(tester),桃儿七的 cDNA 为参照样品(driver),按 PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit(Clontech 公司)的说明书进行抑制差减杂交。SSH 产物用 MiniBEST DNA Fragment Purification Kit Ver. 4.0(TaKaRa 公司)纯化后与 pMDTM 18-T Vector 连接过夜,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。用含有氨苄青霉素的 LB 培养基除去未能转化成功的大肠杆菌,采用蓝白斑筛选阳性克隆。挑取白色克隆摇培过夜后,经引物 Nested PCR primer 1(5'-TCGAGCGGCCCGCCGGCAGGT-3')和 Nested PCR primer 2R(5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3')扩增后进一步鉴定阳性克隆。

1.3 阳性克隆测序及序列分析

随机选取文库中 201 个具有唯一扩增条带的阳性克隆,经活化培养后,菌液用 MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver. 4.0(TaKaRa 公司)提取质粒 DNA,送上海瑞楚生物科技有限公司测序。测序得到的有效 EST 序列经过 Codoncode Aligner 4.0.4 软件的处理后,在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)上进行比对分析,并进行功能注释和归类。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的质量检测和抑制差减杂交效果分析

本研究中分别提取了西藏八角莲与桃儿七根及根茎的 RNA,1% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 1)。结果显示总 RNA 样品的 28S、18S 和 5S 条带清晰,无明显拖尾现象,说明提取的 RNA 完整性好,几乎无降解。用紫外分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度,结果表明,西藏八角莲和桃儿七 RNA 样品的 OD_{260/280} 分别为 1.99 和 2.02,OD_{260/230} 分别为 2.00 和 2.01, RNA 含量分别为 1.90 和 1.63 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,说

明提取的总 RNA 无降解,纯度较高,无多糖和蛋白质污染,质量较好,符合建库要求。

由图 2 可以看出,进行两轮杂交和两轮 PCR 以后,富集了差异表达的基因,去除了共有的序列,因此弥散的 cDNA 片段数量减少,条带亮度降低,差减以后 cDNA 片段整体向下偏移。说明差异表达基因得到了有效地富集和扩增,富集的差异表达片段集中在 400~1 000 bp 小片段范围内。

2.2 SSH 文库的 PCR 鉴定

经过 37℃ 培养箱倒置培养 24 h 和 4℃ 冰箱显色 4 h 后, LB 琼脂平板上出现了明显的蓝色和白色菌落,依据蓝白斑筛选的原理,对在含有氨苄青霉素平板上白色的菌落进行筛选、确认和编号,共发现有 1 179 个白色菌落和 172 个蓝色菌落。本实验得到的文库重组率为 87.3%,已达到构建文库的重组率标准(80.0%)。

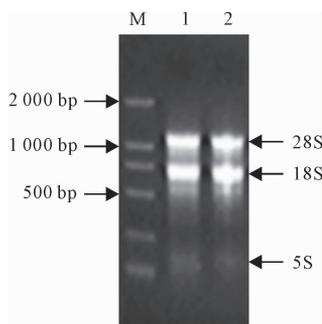
白色克隆经菌落 PCR 扩增后,扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。电泳图(图 3)显示插入片段呈随机分布,长度集中在 250~1 500 bp 之间,平均大小在 750 bp 左右。有少数克隆无扩增条带,无扩增条带的克隆将再次采用 PCR 扩增核实。最后,确

定出具有 1 个扩增条带的克隆共 951 个,这些克隆所携带的 cDNA 信息即为本研究所得的 cDNA 基因文库。

2.3 EST 测序分析

随机选取文库中 201 个阳性克隆进行测序,其中 183 个测序成功,达到 91%。EST 序列在 Codoncode Aligner 4.0.4 软件上分析,去除接头序列、载体序列、信号模糊的片段和低质量序列片段,剩余 157 条有效序列;聚类拼接得到 unique ESTs 共 17 个。通过同源比对和功能查询,其中 3 个没有同源匹配序列;2 个为未知功能的假定蛋白,其余 12 个具有同源匹配序列。

由表 1 可以看出,有同源匹配序列的 unique ESTs 参与西藏八角莲植物体内的多种代谢反应,其中次生代谢类序列的比例最大,达到 33.3%,其次是能量代谢、转录调控和光合作用类序列(16.7%),参与信号转导、防御反应等过程的序列相对较少(8.3%)。亚麻木脂素脱氢酶、dirigent 蛋白、松脂酚-落叶松脂醇还原酶和羧基甲基转移酶是

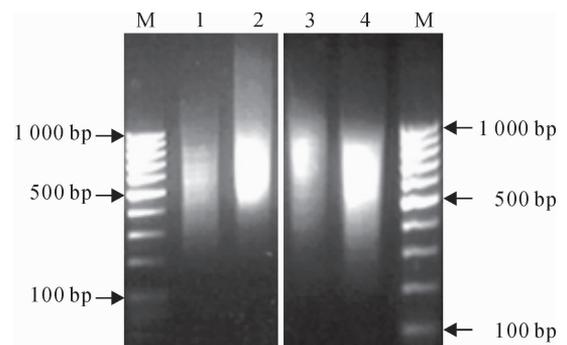


M, DL2000; 1. 西藏八角莲根及根茎总 RNA; 2. 桃儿七根及根茎总 RNA

图 1 总 RNA 凝胶电泳图

M, DL2000; 1. Total RNA of root and rhizome from *Dysosma tsayuensis*; 2. Total RNA of root and rhizome from *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying.

Fig. 1 Electrophoresis results of total RNA



M, DL1000; 1. 差减样品第一轮 PCR; 2. 未差减样品第一轮 PCR; 3. 差减样品第二轮 PCR; 4. 未差减样品第二轮 PCR

图 2 抑制差减杂交效果电泳检测

M, DL1000; 1. First PCR products of subtracted sample; 2. First PCR products of unsubtracted sample; 3. Secondary PCR products of subtracted sample; 4. Secondary PCR products of unsubtracted sample

Fig. 2 Electrophoresis detection of suppression subtractive hybridization efficiency



M, DL2000; 1~24. SSH 文库中随机挑取的白色克隆

图 3 SSH 文库白色克隆的 PCR 扩增产物电泳图

M, DL2000; 1-24. Randomly picked white clones from the SSH library

Fig. 3 Electrophoresis for PCR products of the partially screened white clones from the SSH library

表 1 SSH 文库中部分 unique ESTs 生物信息学分析结果

Table 1 Bioinformatics analysis for a few unique ESTs from the SSH cDNA library

EST 编号 EST No.	同源基因片段编码的蛋白(生物种) Gene product of DNA homology(Species)	期望值 E-value	功能分类 Functional classification
1	亚麻木脂素脱氢酶(桃儿七) Secoisolariciresinol dehydrogenase [<i>Sinopodophyllum hexandrum</i> (Royle) Ying]	5e-94	次生代谢 Secondary metabolism
4	NADH 脱氢酶亚基 F 基因;叶绿体(山荷叶属) NADH dehydrogenase subunit F gene; chloroplast (<i>Diphylleia cymosa</i>)	8e-147	能量代谢 Energy metabolism
5	受体信号蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶(拟南芥) Receptor signalling protein serine/threonine kinase (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	4e-136	信号转导 Signal transduction
7	MYB 转录因子(桃儿七) MYB transcription factor [<i>Sinopodophyllum hexandrum</i> (Royle) Ying]	1e-4	转录 Transcription
8	Dirigent 蛋白(拟南芥) Dirigent protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	4e-19	次生代谢 Secondary metabolism
9	松脂醇-落叶松脂醇还原酶(亚麻属) Pinoresinol-lariciresinol reductase (<i>Linum album</i>)	2e-69	次生代谢 Secondary metabolism
10	羧基甲基转移酶(拟南芥) Carboxyl methyltransferase (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	3e-27	次生代谢 Secondary metabolism
11	1,5-二磷酸核酮糖羧化酶(山荷叶属) Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase (<i>Diphylleia cymosa</i>)	8e-85	光合作用 Photosynthesis
13	WRKY 转录因子(桃儿七) WRKY transcription factor [<i>Sinopodophyllum hexandrum</i> (Royle) Ying]	6e-29	转录 Transcription
14	细胞色素 P450(桃儿七) Cytochrome P450 [<i>Sinopodophyllum hexandrum</i> (Royle) Ying]	1e-09	防御和应激反应 Defense and stress response
16	ATP 合酶 β 亚基基因;叶绿体(山荷叶属) ATP synthase beta subunit gene; chloroplast (<i>Diphylleia cymosa</i>)	1e-104	能量代谢 Energy metabolism
17	PSI III 型叶绿素 a/b 结合蛋白(拟南芥) PS I type III chlorophyll a/b-binding protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	8e-147	光合作用 Photosynthesis

与鬼臼毒素生物合成相关的酶或蛋白。NADH 脱氢酶 F 亚基、ATP 合酶 β 亚基、1,5-二磷酸核酮糖羧化酶和 PSI III 型叶绿素 a/b 结合蛋白是植物光合作用过程中光合电子传递和光合磷酸化所必需的酶复合体的组分。植物初生代谢通过光合作用、柠檬酸循环等途径,为次生代谢提供能量和一些小分子化合物原料。MYB 转录因子和 WRKY 转录因子参与植物的初生和次生代谢反应,在损伤、衰老、发育、代谢物质调节等方面都起到了重要的作用。无功能注释和未匹配的 unique ESTs 可能属于新的功能基因,需进一步研究了解其可能的功能。所有这些 unique ESTs 可能与西藏八角莲与桃儿七根及根茎的鬼臼毒素含量存在差异有关。

3 讨论

西藏八角莲和桃儿七是国家三级保护植物,在中国西藏东南部均有分布,其中西藏八角莲为西藏特有的八角莲属植物种。其植株内含量极微的具抗肿瘤和抗病毒活性的鬼臼类木脂素,具有很高的药用价值。近年来的研究表明,桃儿七根及根茎的鬼臼毒素含量在 4.0~67.0 mg/g^[2,4-5,11]。与西藏八角莲相关的此类研究较少,钟国辉等^[6]用 HPLC 法测定西藏八角莲根及根茎的鬼臼毒素含量为 0.2 mg/g。两者的鬼臼毒素含量相差较大,这与用 HPLC 法测定鬼臼毒素含量的溶液浓度和色谱条件相关外,也表明鬼臼毒素合成能力在物种间与物种内的变异、鬼臼毒素代谢对环境因子的响应与调控

机制等问题都值得进一步研究揭示。

由于西藏八角莲的自然分布具有显著的地域局限性,对其鬼臼毒素代谢途径的分子生物学研究较桃儿七晚十余年。至 2016 年 1 月 10 日,NCBI 网站 Genbank 数据库中西藏八角莲只有 34 条 DNA 序列,而桃儿七的 DNA 序列达到 35 607 条。除开环异落叶松脂醇脱氢酶基因(DtSD)^[24]和松脂醇合成酶基因(DtPS)^[25]被克隆外,其他众多功能基因尚未被克隆。鬼臼毒素来源植物遗传信息的匮乏是限制鬼臼毒素生物合成途径及其调控机制研究的重要原因。构建 SSH 文库是发现差异表达基因,实施表达序列标签(EST)测序计划,进行功能基因研究较好的方法,目前已成功应用于植物中差异表达基因的研究。

本研究首次成功构建了西藏八角莲与桃儿七根及根茎 SSH 文库,获得西藏八角莲优势表达 EST 的克隆 951 个。随机挑选 201 个克隆进行序列测定和分析,聚类拼接得到 unique ESTs 共 17 个,70.6% 的 unique ESTs 有同源匹配序列,新序列出现的比例为 29.4%。所以,本研究的 EST 数目只占 SSH 文库 EST 总数的一小部分。虽然部分测序结果所获得的信息不够全面,但从这些有限的信息里可以大致了解这 2 种鬼臼类药用植物根及根茎差异表达基因的生物學功能及表达丰度,并为后续开展西藏八角莲代谢途径功能基因的克隆和分析,以及发掘影响鬼臼类药用植物鬼臼毒素合成能力的关键因子奠定了基础。

参考文献:

- [1] 廖矛川. 鬼臼类植物化学系统学和资源利用研究[D]. 北京: 中国协和医科大学中国医学科学院, 1995.
- [2] 陈毓亨. 我国鬼臼类植物资源的研究[J]. 药学报, 1979, **14**(2):101-106.
CHEN Y H. A study on the resources of Chinese podophyllin plants[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 1979, **14**(2):101-106.
- [3] 上海市中医文化馆. 神农本草经之鬼臼[DB/OL]. [2015-11-25]. <http://www.pharmnet.com.cn/tcm/knowledge/detail/103222.html>.
- [4] 黄 坤, 蒋 伟, 赵纪峰, 等. 濒危药用植物桃儿七中鬼臼毒素和总木脂素含量测定[J]. 中国中药杂志, 2012, (10):1 360-1 365.
HUANG K, JIANG W, ZHAO J F, *et al.* Determination of podophyllotoxin and total lignans in *Sinopodophyllum emodi*[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2012, (10):1 360-1 365.
- [5] 李艳玲, 徐文华, 周国英, 等. HPLC 法测定青海栽培与野生桃儿七中 2 种木脂素类的含量[J]. 天然产物研究与开发, 2015, (27):94-98.
LI Y L, XU W H, ZHOU G Y, *et al.* Determination of two lignans in Qinghai cultivated and wild *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying by HPLC[J]. *Natural Product Research and Development*, 2015, (27):94-98.
- [6] 钟国辉, 权 红, 袁 雷, 等. 西藏八角莲不同部位鬼臼毒素的 HPLC 分析[J]. 安徽农业科学, 2011, **39**(6):3 262-3 264, 3 315.
ZHONG G H, QUAN H, YUAN L, *et al.* Analysis of podophyllotoxin in different parts of *D. tsayuensis* (Hance) M. Cheng by HPLC[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, **39**(6):3 262-3 264, 3 315.
- [7] 何军忠, 袁家代, 李 娅, 等. 八角莲愈伤组织和组培品及野生品中鬼臼毒素的 HPLC 分析[J]. 四川师范大学学报(自然科学版), 2015, **38**(4):543-549.
HE J Z, YUAN J D, LI Y, *et al.* Analysis of podophyllotoxin among callus, tissue culture seedling and wild *Dysosma versipellis* (Hance) M. Cheng by HPLC[J]. *Journal of Sichuan Normal University(Natural Science)*, 2015, **38**(4):543-549.
- [8] 战凤娇, 杨尚军, 白少岩. 南方山荷叶根的化学成分研究[J]. 中成药, 2013, **35**(3):553-556.
ZHAN F J, YANG S J, BAI S Y. Chemical constituents of roots of *Diphylllea sinensis* H. L. Li[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2013, **35**(3):553-556.
- [9] 中药大辞典. 鬼臼[DB/OL]. [2015-11-25]. <http://tool.zyy123.com/cd/1403.html>.
- [10] 陈洁君, 赵长琦. 鬼臼毒素药源植物及其资源[J]. 生物学通报, 2013, **48**(5):3-7.
- [11] 伍奥林, 李 敏, 等. 地形因子对桃儿七鬼臼毒素含量的影响与生态适宜度研究[J]. 中国中药杂志, 2015, **40**(12):2 299-2 303.
WU A L, LI M, *et al.* Effect of topographical factors on podophyllotoxin content in *Sinopodophyllum hexandrum* and study on ecological suitability[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2015, **40**(12):2 299-2 303.
- [12] 梁世君. 桃儿七人工育苗技术[J]. 农业科技与信息, 2014, **434**(9):56-57.
- [13] 杨 涛, 张 军, 武小龙, 等. 野生濒危中藏药桃儿七人工育苗技术[J]. 中药材, 2012, **35**(12):1 897-1 901.
- [14] XU H, LV M, TIAN X. A review on hemisynthesis, biosynthesis, biological activities, mode of action, and structure-activity relationship of podophyllotoxins:2003-2007[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2009, **16**(3):327.
- [15] ANDREWS R C, TEAGUE S J, MEYERS A I. Asymmetric total synthesis of (-)-podophyllotoxin[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1988, **110**(23):7 854.
- [16] YOUSEFZADI M, SHARIFI M, *et al.* Podophyllotoxin: current approaches to its biotechnological production and future challenges[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2010, **10**(4):281.
- [17] YOU Y. Podophyllotoxin derivatives: current synthetic approaches for new anticancer agents[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2005, **11**(13):1 695.
- [18] PAN J, CHEN S, YANG M, *et al.* An update on lignans: natural products and synthesis[J]. *Natural Product Reports*, 2009, **26**(10):1 251.
- [19] DIATCHENKO L, LIU Y F, *et al.* Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, **93**(12):6 025-6 030.
- [20] 张重义, 范华敏, 杨艳会, 等. 连作地黄 cDNA 消减文库的构建及分析[J]. 中国中药杂志, 2011, **36**(3):276-280.
ZHANG Z Y, FAN H M, YANG Y H, *et al.* Construction and analysis of suppression subtractive cDNA libraries of continuous mono culture *Rehmannia glutinosa*[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2011, **36**(3):276-280.
- [21] ASHUTOSH K, SHUKLA, AJIT K, *et al.* Transcriptome analysis in *Catharanthus roseus* leaves and roots for comparative terpenoid indole alkaloid profiles[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, **57**(14):3 921-3 932.
- [22] LI D M, *et al.* Identification of warm day and cool night conditions induced flowering-related genes in a *Phalaenopsis orchid* hybrid by suppression subtractive hybridization[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2014, **13**(3):7 037-7 051C.
- [23] 杨嫦丽, 王有国, 王祥宁, 等. 镰刀菌诱导的泸定百合 SSH 文库构建及抗病相关基因筛选[J]. 西北植物学报, 2014, **34**(11):2 170-2 175.
YANG C L, WANG Y G, WANG X N, *et al.* Construction of *Lilium sargentiae* SSH library induced by *Fusarium oxysporum* and screening of the resistance related gene[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2014, **34**(11):2 170-2 175.
- [24] LAN X Z, REN S X, YANG Y J, *et al.* Molecular cloning and characterization of the secoisolariciresinol dehydrogenase gene involved in podophyllotoxin biosynthetic pathway from Tibet *Dysosma*[J]. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2010, **4**(6):484-489.
- [25] LAN X Z, REN S X, YANG Y J, *et al.* Molecular cloning and characterization of the gene encoding pinosresinol synthase from Tibet *Dysosma*[J]. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2011, **5**(18):4 470-4 474.

(编辑:宋亚珍)