

细辛苯丙素类化合物生物合成相关酶基因的挖掘及其表达分析

潘磊¹, 林懋怡¹, 赵晓冰^{1,2}, 柳威¹, 刘晋杰¹, 刘忠^{1*}

¹上海交通大学药学院; ²华东师范大学生命科学院, 上海 200240

摘要: 为了探明细辛苯丙素类化合物生物合成相关酶基因的表达水平, 本研究基于实验室已构建好的细辛转录组数据库, 根据基因功能注释筛选出与苯丙素类化合物生物合成相关酶基因, 并推导其蛋白序列, 进行生物信息学分析, 同时对相关酶基因进行基因的表达分析。本文从细辛转录组数据库中筛选出了 6 个酶基因, 分别为 *pal*, *c4h*, *comt*, *4cl*, *ccr*, *cad*。基因编码蛋白特性分析结果表明: 6 个酶基因所编码的蛋白属于不同的超家族。基因表达分析结果表明: 6 个酶基因表达量呈现相同的变化规律。对于叶、叶柄、根、根茎, 6 个酶基因在花期的表达量较花前期的高; 同时, 6 个酶基因在地下部分的表达量比地上部分的高。以上结果显示 6 个酶基因在细辛叶、叶柄、根、根茎的表达量差异明显, 但具有一定的规律性。研究的成功开展为我们进一步了解苯丙素类化合物生物合成相关酶的功能和特性打下了基础, 为今后细辛活性成分的生物合成及代谢调控提供理论依据。

关键词: 细辛; 苯丙素; 甲基丁香酚; 榄香素; 黄樟醚; 生物信息学分析; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: R932

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.5.003

Mining and Expression Analysis of Enzyme Genes Relevant to the Biosynthesis of Phenylpropanoids in *Asarum*

PAN Lei¹, LIN Mao-yi¹, ZHAO Xiao-bing^{1,2}, LIU Wei¹, LIU Jin-jie¹, LIU Zhong^{1*}

¹School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University; ²School of Life Sciences,

East China Normal University, Shanghai 200240, China

Abstract: In order to explore the expression level of enzyme genes relevant to the biosynthesis of phenylpropanoids in *Asarum*, the enzyme genes relevant to the biosynthesis of phenylpropanoids were screened out according to the gene functional annotation which was based on the database of *Asarum* transcriptome constructed in the laboratory. The protein sequence was deduced and was analyzed by bioinformatics. Meanwhile, expression analysis of the enzyme genes was carried out. Six enzyme genes were screened out from the transcriptome of *Asarum*, including *pal*, *c4h*, *comt*, *4cl*, *ccr* and *cad*. The protein sequence encoded by six enzyme genes had different superfamily. The expression level of six enzyme genes showed the same changes. For leaf, petiole, root and rhizome, the expression level of six enzyme genes in flowering stage was higher than that in early flowering stage, and the expression level of six enzyme genes in the underground part was higher than that in the aboveground part. The above results showed that the expression level of six enzyme genes in leaf, petiole, root and rhizome of *Asarum* was different, but there was a certain regularity. The success of this study will lay a foundation for further understanding of the functions and characteristics of the enzymes relevant to the biosynthesis of phenylpropanoids, and provide a theoretical basis for future biosynthesis and metabolic regulation of active ingredients in *Asarum*.

Key words: *Asarum*; phenylpropanoid; methyl eugenol; elemene; safrole; bioinformatics analysis; quantitative real-time PCR

细辛 (*Asari Radix et Rhizoma*) 味辛性温, 具解热^[1]、抗炎^[2,3]、镇静、镇痛^[4,6]、强心、抗心肌缺

血^[7-9]等多种药理作用。《中国药典》^[10] 记载细辛来源于马兜铃科植物北细辛 *A. heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitaq.、汉城细辛 *A. sieboldii* Miq. F. *seoulense* (Na-kai) C. Y. Cheng et C. S. Yang 和华细辛 *A. sieboldii* Miq. 干燥的根和根茎。根据本草学考证, 细辛以根入药, 采集

收稿日期: 2016-11-29 接受日期: 2017-01-16

基金项目: 国家自然科学基金 (81373962); 上海市自然科学基金 (13ZR1420900)

* 通信作者 Tel: 86-21-34208145; E-mail: liuzhong@sjtu.edu.cn

时间以农历二月和八月为适。如《名医别录》(汉末)曰“细辛二月、八月采根,阴干”,《本草图经》(宋代)曰“其根细而味极辛,故名之曰细辛。二月、八月采根,阴干”,《本草害利》(清代)曰“二、八月采根纯阳,切去头子”。现代的研究也显示,细辛采收时间一般在4~5月和9月,此时甲基丁香酚、黄樟醚和榄香素等活性成分含量最高,药材品质最好,为细辛最佳采集时节^[11,12]。

细辛的主要功效物质是挥发油。甲基丁香酚、榄香素、黄樟醚三种成分存在于所有细辛品种的挥发油中,是细辛挥发油的特征成分^[13],也常常被纳为评价细辛药材品质的指标成分^[14]。对挥发油含量及其成分动态变化的研究表明,甲基丁香酚、榄香素、黄樟醚等细辛活性成分的含量在细辛不同生长发育期、不同组织器官之间存在明显差异^[15-17]。就组织器官而言,细辛活性成分在地下部分的内容明显高于地上部分;就生长发育期而言,细辛活性成分以花期含量最高。在植物次生代谢物中,甲基丁香酚、榄香素、黄樟醚(图1)等细辛活性成分大部分属于基本结构为C₆-C₃的苯丙素类^[18],因此对细辛苯丙素类化合物生物合成相关酶基因表达水平的研究,可以为今后细辛活性成分的生物合成及代谢调控提供理论依据。目前,细辛苯丙素类化合物生物合成相关酶基因表达水平的研究还尚未见有报道。因此,本实验根据已构建好的细辛转录组数据库,通过基因功能注释筛选苯丙素类化合物生物合成相关酶基因,并分析其核苷酸及蛋白质的特性,比较不同时期地上部分、地下部分相关酶基因表达水平,为进一步解析细辛药材活性成分含量变化内在规律、定向调控细辛活性成分的生物合成、有效控制细辛药材质量打下基础。

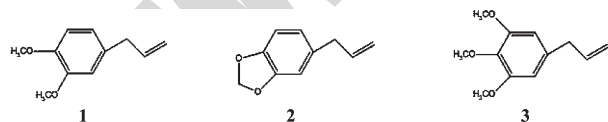


图1 甲基丁香酚(1)、黄樟醚(2)和榄香素(3)的化学结构
Fig. 1 Chemical structures of compounds methyleugenol (1), safrole (2) and elemicin (3)

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

细辛新鲜植物来源于陕西省宁强县,经上海交

通大学药学院王梦月副教授鉴定为马兜铃科细辛属植物华细辛。本实验所用的细辛材料分别为3月中旬(简称花前期)的叶、叶柄、根、根茎和5月下旬(简称花期)的叶、叶柄、根、根茎。

1.1.2 实验试剂

植物RNA提取试剂盒(RNeasy? Plant Mini Kit),购自德国QIAGEN公司;cDNA合成试剂盒,购自北京天根生化科技有限公司;荧光定量试剂盒[SuperRealPreMix Plus(SYBR Green)],购自北京天根生化科技有限公司。

1.1.3 实验仪器

Mastercycler nexus GX2 PCR仪,购自德国Eppendorf公司;DYY-6C型琼脂糖凝胶电泳仪,购自北京六一生物科技有限公司;Nanodrop2000微量紫外分光光度计,购自美国Thermo公司;Champgel 5000型凝胶成像系统,购自北京赛智创业科技有限公司;ABI Prism StepOne 荧光定量PCR仪,购自美国ABI公司。

1.2 实验方法

1.2.1 相关酶基因序列的获得与生物信息学分析

基于实验室已构建好的细辛转录组数据库,根据基因功能注释筛选出与苯丙素类化合物生物合成相关酶基因,并推导出蛋白序列。借助ExPASy数据库的ProtParam在线工具(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)对基因编码蛋白序列进行基本理化性质分析,包括氨基酸残基数、理论等电点、脂溶指数、蛋白质疏水性、不稳定系数、分子量等。运用SOPMA(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.html)在线工具进行编码蛋白的二级结构分析,包括 α 螺旋、不规则盘绕、延伸链、 β 转角等。通过NCBI网站的Conserved Domains Database(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)对编码蛋白的超家族类型进行分析。

1.2.2 实时荧光定量PCR检测基因表达量

1.2.2.1 总RNA提取和cDNA合成

用RNeasy Plant Mini Kit提取细辛不同时期地上部分、地下部分样品总RNA,包括花前期的叶、叶柄、根、根茎和花期的叶、叶柄、根、根茎。1.2%琼脂糖凝胶电泳确定RNA完整性,Nanodrop2000微量紫外分光光度计测定总RNA的A₂₆₀和A₂₈₀的值,选择A₂₆₀/A₂₈₀为1.8~2.0的总RNA进行逆转录,逆转录反应按照cDNA合成试剂盒说明书进行操作。

1.2.2.2 实时荧光定量PCR

利用 Primer Premier 5.0 软件设计相关酶基因实时荧光定量 PCR 引物(引物序列见表 1),扩增长度在 100 ~ 250 bp 之间。内参基因为 18s rRNA,内参基因的筛选基于实验室前期的工作基础。实时荧光定量 PCR 反应体系为:2 × SuperReal PreMix Plus 10 μL、50 × ROX Reference Dye 2 μL,正反向引物(浓度稀释为 10 μM)各 0.6 μL、cDNA 模板 100 ng、RNase-free ddH₂O 至 20 μL。反应程序设置为:95 °C 15 min 预变性,95 °C 10 sec,60 °C 20 sec 共 40 个循环。每个反应做三个平行试验,结束后进行熔

表 1 实时荧光定量 PCR 引物

Table 1 Primers for qRT-PCR

目标基因引物序列(5'-3') Target gene	Primer sequence(5'-3')
<i>pal</i>	F:AAGGCTGTTACCGCTGACG R:CACCAAGGATGCTAGACCG
<i>c4h</i>	F:GTTGTGCCATTGAGACTACAC R:CGCTTCTTAACGACTGCTT
<i>comt</i>	F:CACCCCTCAACCTCATCATCTC R:CAGGCAATGCTCGTCACTC
<i>4cl</i>	F:TGGAGGACACCGTTAGACG R:AGTCCCAGCAAGACCCAGAT
<i>ccr</i>	F:CGATTGAGGGGACGAAG R:TGACTGTGCCAGGATTGAC
<i>cad</i>	F:CGAGATTGTCGGTATTGTGC R:CCTCCTTTGTGATTGTGCC

注:F:正向引物;R:反向引物。

Note:F:Forward primer;R:Reverse primer.

表 2 相关蛋白质的理化性质

Table 2 General chemical and physical characteristics of relevant genes

酶 Enzyme	氨基酸残基数 Amino acid residues	分子量 Molecular weight(kD)	理论等电点 Theoretical PI	不稳定指数 Instability index	脂溶性指数 Aliphatic index	疏水性平均值 Grand average of hydropathicity
PAL	718	78.74	6.24	36.79	91.56	-0.158
C4H	504	53.45	7.80	44.63	99.56	0.090
COMT	360	39.50	5.63	39.12	97.00	0.095
4CL	540	58.72	5.70	35.28	98.59	0.032
CCR	321	35.37	5.88	36.49	101.39	0.023
CAD	355	38.70	6.46	33.90	91.35	-0.028

2.2.2 二级结构预测

通过在线工具 SOPMA 对 6 个基因编码蛋白的二级结构进行预测(见表 3)。其中 α-螺旋是 PAL、C4H、COMT、CCR 蛋白质二级结构中最主要的结构元件,而 4CL 和 CAD 蛋白质二级结构中最主要的结构元件是无规则卷曲。通过对二级结构和超家族类型的预测,发现各个基因的二级结构和超家族类型

解曲线分析。各基因表达量以内参基因 18s rRNA 作为标准进行相对定量,采用的方法是 2^{-ΔΔCt}法。

2 实验结果

2.1 相关酶基因的获得

从细辛转录组数据库中筛选得到了 6 个苯丙素类化合物生物合成相关酶基因,分别为苯丙氨酸氨解酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL),肉桂酸-4-羟基化酶(cinnamate-4-hydroxy lase, C4H),咖啡酸-O-甲基转移酶(caffeic acid-3-O-methyltransferase, COMT),4-香豆酸辅酶 A 连接酶(cinnamate-4-hydroxylase, 4CL),肉桂酰辅酶 A 还原酶(cinnamoyl-CoA reductase, CCR),肉桂醇脱氢酶(cinnamoyl alcohol dehydrogenase, CAD)。

2.2 相关酶基因编码蛋白的特性分析

2.2.1 基本理化性质分析

利用 ProtParam 在线工具对 6 个酶基因编码蛋白序列进行基本理化性质分析(见表 2)。从表格中可以看出,c4h 基因编码的蛋白偏碱性,稳定性系数大于 40,稳定性较差,属于碱性不稳定性蛋白。其它基因编码的蛋白偏酸性,稳定系数均小于 40,具有较好的稳定性。此外,pal 及 cad 基因编码的蛋白为亲水性蛋白,其它基因编码的蛋白为疏水性蛋白。理化性质的分析研究,为今后蛋白的表达、提取与分离、含量测定等提供了一定的参考依据。

都不尽相同,这为接下来基因的差异表达提供了解释,为以后各个基因的功能验证提供了一份参考。

2.3 细辛不同组织部位的总 RNA 检测

用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测细辛不同组织部位的总 RNA,得到 3 个条带,分别为 28 s, 18 s, 5 s rRNA(图 2),A₂₆₀/A₂₈₀值均在 1.8 ~ 2.0 之间,表明 RNA 完整性较好,无蛋白质和 DNA 污染,适合进一步逆转录反应。

表3 相关酶的蛋白质二级结构信息(%)

Table 3 Secondary structure characteristics of related enzymes(%)

酶 Enzyme	α -螺旋 Alpha helix	β -转角 Beta turn	不规则卷曲 Random coil	延伸链 Extended strand	超家族 Superfamily
PAL	50.97	9.05	27.30	12.67	Lyase_I_like
C4H	60.00	8.08	19.62	12.31	P450
COMT	43.33	12.50	28.33	15.83	AdoMet_MTases
4CL	26.30	10.00	39.81	23.89	AFD_class I
CCR	44.24	6.54	30.84	18.38	NADB_Rossmann
CAD	21.13	13.24	34.65	30.99	MDR

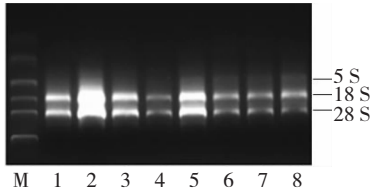


图2 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of total RNA

注: M: marker; 1: 花前期的叶; 2: 花期的叶; 3: 花前期的叶柄; 4: 花期的叶柄; 5: 花前期的根; 6: 花期的根; 7: 花前期的根茎; 8: 花期的根茎

Note: M: marker; 1: Leaf in early flowering stage; 2: Leaf in flowering stage; 3: Petiole in early flowering stage; 4: Petiole in flowering stage; 5: Root in early flowering stage; 6: Root in flowering stage; 7: Rhizome in early flowering stage; 8: Rhizome in flowering stage

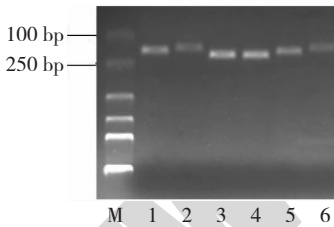


图3 扩增产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification of relevant genes

注: M: marker; 1: *pal* 基因; 2: *c4h* 基因; 3: *comt* 基因; 4: *4cl* 基因; 5: *ccr* 基因; 6: *cad* 基因

Note: M: marker; 1: *pal* gene; 2: *c4h* gene; 3: *comt* gene; 4: *4cl* gene; 5: *ccr* gene; 6: *cad* gene

2.4 基因目的片段的扩增

如图3所示,目标条带范围在100~250 bp之间,说明引物符合实时荧光定量PCR的要求。

2.5 基因目的片段熔解曲线

如图4所示,熔解曲线为单峰,没有非特异性扩增的杂峰及引物二聚体的低矮小峰出现,表明引物

的特异性较强,符合定量检测要求。

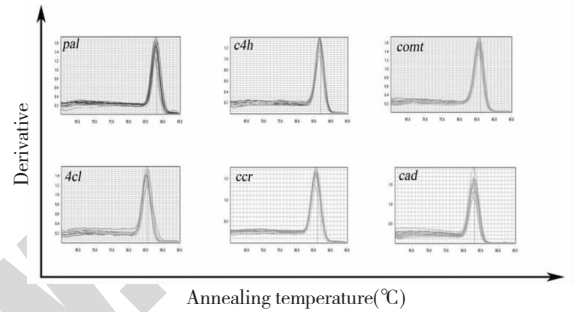


图4 基因目的片段熔解曲线

Fig. 4 Melting curve of gene target fragment

2.6 基因表达分析

如图5所示,*pal*、*c4h*、*comt*、*4cl*、*ccr*、*cad*这6个酶基因在不同时期的表达量呈现相同的变化规律。对于叶、叶柄、根、根茎,6个酶基因在花期的表达量较花前期的高。同时,6个酶基因在地下部分的表达量比地上部分的高。*c4h*和*pal*这两个基因在根和根茎中的表达活性明显高于叶和叶柄。

3 讨论与结论

基因挖掘是进行基因功能分析和进一步进行遗传操作的基础。随着分子生物学理论和研究技术的进步,基因挖掘的新理论和新方法不断涌现。比如定位克隆法,自其首次应用以来^[19],已经挖掘出大量的植物抗病基因^[20]。除上述方法之外,Li等^[21]应用同源克隆法,根据在拟南芥中鉴定出的耐抽薹基因*flc*序列,利用RACE-PCR技术从大白菜中克隆出了*flc*同源基因。陈建省等^[22]利用基因芯片技术成功构建了小麦21条染色体的分子遗传图谱,为进行其他性状的QTL分析提供了理论依据。张俊芳^[23]通过抑制性差减杂交技术(SSH)克隆出了香蕉乙烯应答因子结合蛋白(ethylene responsive factor

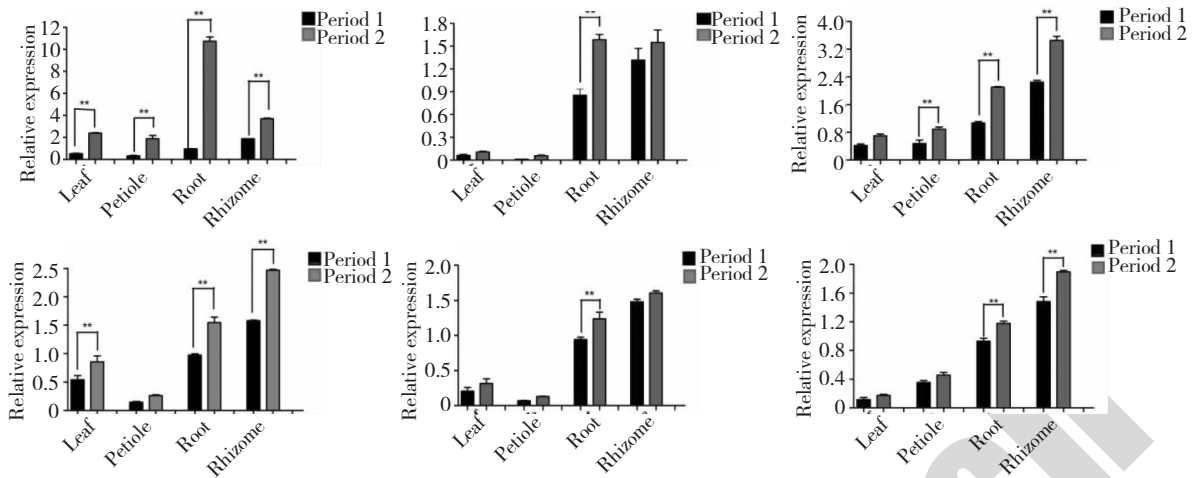


图5 基因的相对表达量

Fig. 5 The relative expression of genes

注:period1:花前期;period2:花期

Note:period1:The early flowering stage;period2:The flowering stage

binding protein, ERF) 基因并命名为 *MaERF* 和决定表皮毛发育的关键转录因子(v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog, MYB) 基因并命名为 *MaMYB*, 这些基因都与香蕉的果皮带毛基因有关。李海英等^[24] 运用 mRNA 差异表达技术分离甜菜 M₁₄ 品系特异表达基因, 共获得了 6 个阳性差异表达的 cDNA 片段, 为克隆无融合生殖基因提供了可能。本研究运用的是转录组测序技术, 与上述常规方法相比, 具有灵敏度高、信号数字化、检测范围广等优点, 已被广泛应用于生物体的多种功能研究^[25]。然而, 目前转录组研究对象还主要集中于 mRNA 及 miRNA, 研究发现植物在转录水平还有 hc-siRNA、phasiRNA、NAT-siRNA 和 circRNA 等其他多种产物。因此, 如果能够利用转录组对这些非编码小 RNA 进行分析, 将有助于进一步扩大检测范围、丰富基因数据库, 对今后中药遗传品质的改良和次生代谢工程的实施具有重大的实践意义。

本研究对细辛苯丙素类化合物生物合成相关酶基因表达情况的分析, 有助于了解细辛苯丙素类化合物合成代谢机制及其含量变化内在规律, 从而定向调控细辛活性成分的生物合成。基因表达分析结果显示, *pal*、*c4h*、*comt*、*4cl*、*ccr* 和 *cad* 这 6 个酶基因在细辛叶、叶柄、根、根茎的表达差异明显, 但具有一定的规律性。从不同的时期来看, 6 个酶基因在花期的表达量比花前期的高, 有研究报道指出, 细辛活

性成分在花期含量较高^[12]; 从不同组织部位来看, 6 个酶基因在地下部分的表达量高于地上部分, 相关研究报道也指出, 细辛活性成分在地下部分的含量比地上部分的高^[15]。因此, 基因表达量与细辛活性成分的含量可能存在直接的相关性, 这为今后的研究提供了方向。从苯丙素类化合物生物合成途径来看^[26-28], 在香豆酸、香豆酸辅酶 A、阿魏酸、阿魏酸辅酶 A 等多处都衍生出支路, COMT、4CL、CCR 和 CAD 酶均处在多条支路上, 而 PAL 和 C4H 酶控制着苯丙素类化合物生物合成的“源头”。因此, *pal* 和 *c4h* 基因的表达水平对细辛活性成分和苯丙素类化合物的含量影响可能比 *comt*、*4cl*、*ccr* 和 *cad* 基因更显著。如图 5, *pal* 和 *c4h* 基因在根和根茎中的表达量明显比在叶和叶柄中的高, 这可能也间接地为细辛的药用部位是根和根茎提供了一定的依据。对于之后的研究内容, 我们首先将着重从 *pal* 和 *c4h* 这两个基因出发, 阐释其表达量高低与甲基丁香酚、黄樟醚、榄香素等细辛活性成分含量大小之间的关系, 在此基础上, 进一步探明 *comt*、*4cl*、*ccr* 和 *cad* 这四个基因对细辛活性成分合成途径及代谢调控的影响。

本研究的成功开展为深入了解细辛苯丙素类化合物的遗传背景及分子合成机制提供了依据, 为进一步探索甲基丁香酚、黄樟醚、榄香素等细辛活性成分生物合成相关酶的功能和特性打下了基础, 具有积极的理论和实践意义。

参考文献

- Akkiraju PC, Mamillapalli S. A study on nephroprotective and antiurolithiasis activities of ethanolic extract of *Asarum europaeum* leaves against gentamicin induced nephrotoxicity in Wistar rats. *Int J Adv Res*, 2015, 3:1241-1247.
- Huang J, Wang HQ, Zhang C, et al. A new tetrahydrofuran-type lignan with anti-inflammatory activity from *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum*. *J Asian Nat Prod Res*, 2014, 16:387-392.
- Xiong YL (熊玉兰), Jing Y (荆宇), Shang MY (尚明英), et al. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects in mice of water and ethanol extracts of roots and rhizomas of *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum*. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2009, 34:2252-2257.
- Yang H (杨浩), Wang L (王磊), Wei JL (魏景莉), et al. An experimental study of feasibility on substituting asarum extraction analgesia form orphine analgesia. *Chin J Clin Res* (中国临床研究), 2010, 23:568-570.
- Wu N, Yan X, Zhang S, et al. Chinese medicinal compositions for treating headache, formulations and processes for preparation thereof: EP, EP20060775453, 2008.
- Yuan XQ (袁晓琴), Sun LF (孙连芬), Zheng J (郑进). Analgesic components of asarum and its mechanisms. *Shanghai J Tradit Chin Med* (上海中医药杂志), 2009, 43(5):72-75.
- Zhang Y (张瑶), Song ZY (宋志永), Wang LL (王林丽). Pharmacological effects and clinical application of Asarum. *Chin Pharm* (中国药业), 2007, 16(14):62-63.
- Shi HX (石含秀), Jia B (贾波), Han L (韩林), et al. Effect of Asarum medicated serum on sodium channel of rat myocardial cells. *Fujian J Tradit Chin Med* (福建中医药), 2009, 40(4):42-45.
- Yuan P, Yang JH, Zhang YY, et al. Experimental research on the protection of the mixture nasal drop of borneol and asarum in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury. *World J Int Tradit Wes Med*, 2009:859-861.
- Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2015. 230.
- Dong CR (董丛荣), Shi CR (施丛蓉), Yu YQ (于砚青). Study on volatile oil of *Asarum heterotropoides* in different growing periods. *Heilongjiang Med Pharm* (黑龙江医药科学), 2001, 1:60.
- Cai SQ (蔡少青), Chen SZ (陈世忠), Xie LH (谢丽华), et al. The influence of plant age and collecting period on the volatile oil of *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* roots. *Beijing J Med Univ* (北京医科大学学报), 1997, 29:336.
- Yang CP (杨春澎), Zhang JJ (张家俊), Pan JG (潘炯光), et al. Analysis of volatile oil from asarum by gas chromatography-mass spectrometry (4th Report). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1986, 11(7):39-43.
- Zhang F (张峰), Fu SP (付邵平), Xu Q (徐青), et al. Study on GC fingerprint of the constituents in Herba Asari. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2004, 29:411-413.
- Wang D (王栋), Wang XJ (王喜军), Xia XH (夏晓辉). Analysis of season variation of methyl eugenol and safrole in *Asarum heterotropoides* by gas chromatography. *Chin J Chromatogr* (色谱), 1997, 15:85-86.
- Wu YR (吴艳蓉), Jia LY (贾凌云), Gao FK (高福坤), et al. Quantitative determination of essential oil in *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxin) Kitag. produced in different seasons and places. *Shenyang J Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2006, 23:285-288.
- Chen B (陈蓓), Hu SY (胡苏莹), Li KW (李昆伟), et al. The volatile components of three Radix et Rhizoma Asari. *J Chin Med Mat* (中药材), 2010, 33:1886-1893.
- Nanjing University of Traditional Chinese Medicine (南京中医药大学). Dictionary: Traditional Chinese Medicine (中药大辞典). Second Edition. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2006. 2086.
- Martin GB, Brommonschenkel SH, Chunwongse J, et al. Map-based cloning of a protein kinase Gene conferring Disease Resistance in Tomato. *Science*, 1993, 262:1432-1436.
- Li WF (李文凤), Liu YC (刘永春), Wu LR (吴立人). Recent advances in cloning and functional analysis of plant disease resistance genes. *Chin Bull Life Sci* (生命科学), 2001, 13:151-153.
- Li ZG, Zhao LX, Cui CS, et al. Molecular cloning and characterization of an anti-bolting related gene (BrpFLC) from *Brassica rapa* ssp. *Pekinensis*. *Plant Sci*, 2005, 168:407-413.
- Chen JS (陈建省), Chen GF (陈广凤), Li QF (李青芳), et al. Construction of Genetic Map Using Genotyping Chips and QTL Analysis of Grain Weight. *Chin J Agri Sin* (中国农业科学), 2014, 47:4769-4779.
- Zhang JF. Isolation and analysis of genes associated with mutant about pilose fruit in Banan (*Musa* spp.). Haikou: Hainan University, 2013.
- Li HY (李海英), Ma CQ (马春泉), Yu B (于冰), et al. Extraction cDNA fragments specially expressed in lines M₁₄ in sugar beet by mRNA differential display. *Bull Bot Res* (植物研究), 2007, 27:465-468.