

穗花杉的转录组测序及其转录组特性分析

王 帅¹, 邵芬娟¹, 李 论², 芦 强¹, 邱德有^{1*}

(1. 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091; 2. 广西桂林小庐山生态农业发展有限公司, 广西 桂林 541205)

摘要: [目的] 通过对红豆杉科穗花杉属的穗花杉进行转录组测序, 为穗花杉的萜类合成途径和分类学研究提供支持。[方法] 利用 HiSeq2500 技术对穗花杉的茎叶进行转录组测序。[结果] 穗花杉转录组测序共得到 8.14 Gb 的 clean data。从头组装共获得 82 884 条 unigene, 其中有 27 495 条 unigene 被注释。此外, 在 82 884 条 unigene 中共搜索到 2 827 个 SSR 位点, 单核苷酸重复 SSR 出现频率最高(60.1%), 其次为三核苷酸重复 SSR(25.4%)。在穗花杉 unigene 中挖掘出了 1 个牻牛儿基焦磷酸合成酶(GPS)、1 个法尼烯基焦磷酸合成酶(FPS)和 5 个牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶(GGPS)的同源基因, 同时得到紫杉二烯合成酶(TS)同源基因 13 个。[结论] 发现了 20 个与萜类合成有关的 unigene 和 2 827 个 SSR 位点, 为今后穗花杉萜类生物合成研究, 特别是紫杉二烯合成酶编码基因的研究打下了基础, 也为该物种系统分类地位及遗传多样性研究提供了新的遗传信息。

关键词: 穗花杉; 转录组; SSR; 萜类合成基因; 分类

中图分类号: 718.46

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2017)05-0759-06

Transcriptome Sequencing and Analysis of *Amentotaxus argotaenia* (Hance) Pilger

WANG Shuai¹, SHAO Fen-juan¹, LI Lun², LU Qiang¹, QIU De-you¹

(1. The Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091 China;

2. Guangxi Guilin XiaoLuShan Ecological Agriculture Co. Lit, Guilin 541205, Guangxi, China)

Abstract: [Objective] The transcriptome of *Amentotaxus argotaenia* (Hance) Pilger of *Amentotaxus* in *Taxaceae* was sequenced and analyzed for its terpenoid biosynthetic pathway and taxonomy research. [Method] The transcriptome of the mixture of stem and leaf of *A. argotaenia* was sequenced by using HiSeq2500. [Result] 8.14 Gb clean data was obtained from the transcriptome of *A. argotaenia*. 82 884 unigene were obtained and 27 495 unigene were annotated using the six public databases. Besides, 2 827 SSRs were identified from the 82 884 unigene. The most abundant type of repeat motif was mono-nucleotides (60.1%), followed by tri-nucleotides (25.4%). Among the unigenes of *A. argotaenia*, one homologous gene of geranyl diphosphate synthase (GPS), one homologous gene of farnesyl diphosphate synthase (FPS) and five homologous genes of geranylgeranyl diphosphate synthase (GGPS) were identified. In addition, 13 homologous genes to taxadiene synthase gene (TS) in *Taxus* were obtained using TBLASTN. [Conclusion] In this study, 20 unigenes relating to terpenoid biosynthesis and 2 827 SSRs were identified in *A. argotaenia*. Our work will facilitate the study about the terpenoid biosynthetic genes especially taxadiene synthase gene in *A. argotaenia* and may provide some foundational genetic data to study its taxonomy and diversity.

Keywords: *Amentotaxus argotaenia*; transcriptome; SSR; terpenoid biosynthesis pathway gene; taxonomy

收稿日期: 2016-02-06

基金项目: 国家重点研发计划“极小种群野生植物就地保护及生境恢复技术与示范”课题(2016YFC0503103)。

作者简介: 王 帅(1988—), 男, 山东淄博人, 在读博士, 研究方向为次生代谢途径相关基因研究。E-mail: hotboyshuai@126.com.

* 通讯作者: 邱德有, 男, 博士生导师, 研究员, 研究方向为次生代谢研究。E-mail: qiudeyou@caf.ac.cn.

穗花杉属 (*Amentotaxus*) 是红豆杉科 (*Taxaceae*) 的一个属, 作为一个非常古老的家系存在于欧亚大陆。在第三纪和第四纪冰川时代, 穗花杉属经历了多次群体扩张和紧缩, 也因此形成了如今的分布格局^[1]。穗花杉 (*Amentotaxus argotaenia* (Hance) Pilger) 是穗花杉属的一个种, 有“冰川元老”的美称, 主要分布于我国南部地区, 以福建、江西、广东等省为主, 也是我国三级重点保护的珍稀濒危植物。

在裸子植物系统分类上, 穗花杉具有很重要的研究价值, 因为研究者们从穗花杉被发现以来, 一直对它的分类地位有争论^[2]。早在 1883 年 Hance 发现穗花杉将其定名发表, 并将其置于罗汉松属 (*Podocarpus*) 内^[3]。20 世纪初, Pilger 根据穗花杉小孢子叶球形态, 将它转入三尖杉属 (*Cephalotaxus*)^[4]。但是, 随后 Pilger 根据穗花杉雄状花序的形态特征将穗花杉单独列为三尖杉科 (*Cephalotaxaceae*) 的一个属—穗花杉属^[5]。1931 年, 通过观察穗花杉生殖器官的形成特征, 工藤认为它应该成立一个穗花杉科或是作为红豆杉科的一个亚科或族^[6]。1951 年, Florin 发现三尖杉属和穗花杉属间的气孔结构和大孢子叶球有差异, 所以将穗花杉属归入红豆杉科。我国植物学者也在上世纪从各个学科领域对穗花杉的系统分类学做了大量的研究^[7]。其中, 马忠武发现穗花杉属植物不含有红豆杉属和榧树属的植物中存在的双黄酮类特征化学成分, 所以他对穗花杉属归于红豆杉科提出怀疑^[8]。

为了为穗花杉的研究提供基因层面的数据, 本研究利用 HiSeq2500 技术对穗花杉茎叶进行了转录组测序。穗花杉转录组测序共得到约 8.14 Gb 的 clean data, 从头拼接后共获得 82 884 条 Unigene 和 140 286 条 Transcript。通过功能注释, 得到了萜类合成相关基因, 以及紫杉二烯合成酶的同源基因。同时预测了穗花杉转录组序列的 SSR 位点。这为今后穗花杉萜类次生代谢和穗花杉分类学地位的研究奠定了一定的基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

穗花杉材料由桂林小庐山生态农业发展有限公司提供。盆栽于中国林业科学研究院温室里。取当年生单株带叶的枝条, 采集后立即放入液氮中, 之后存于 -80℃ 冰箱中待用。

1.2 cDNA 文库构建与转录组测序

总 RNA 的提取采用 Omega Total RNA kit II (O-

mega, USA) 试剂盒, 按照实验说明书操作。分别采用 Nanodrop、Qubit 2.0、Aglient 2100 方法检测 RNA 样品的纯度、浓度和完整性。样品的 RIN 值 >7。总 RNA 检测合格后, 用带有 Oligo (dT) 的磁珠富集 mRNA, 再将 mRNA 随机打断成小片段。以片段化的 mRNA 为模板, 合成双链 cDNA, 纯化后进行末端修复、加 A 尾和接头。经过片段大小筛选后, 通过 PCR 扩增富集得到 cDNA 文库。构建好的文库利用 Illumina HiSeq2500 进行测序。

1.3 序列组装与拼接

得到测序数据后, 对 raw read 进行数据过滤, 去除其中的接头序列及低质量 read 获得高质量的 clean read (质量值 $Q < 20$ 的碱基数占整个 read 的 50% 以上)。得到的 clean read 利用 Trinity^[9] 进行从头拼接成为片段 (contig), 参数选用 Trinity 的省缺参数 $Kmer = 25$ 。然后, 拼接好的片段进一步整合成为转录本和 unigene。

1.4 基因功能注释

使用 BLASTx 软件将拼接得到的 unigene 序列与 NR、Swiss-Prot、GO、COG、KOG、KEGG 数据库比对, 使用 KOBAS2.0^[10] 得到 unigene 在 KEGG 中的 KEGG Orthology 结果, 预测完 unigene 的氨基酸序列之后使用 HMMER^[11] 软件与 Pfam^[12] 数据库比对, 获得 unigene 的注释信息。

1.5 SSR 位点分析

使用 MISA 软件分析穗花杉 unigene 序列可以得到 6 种类型的 SSR: 单碱基重复 SSR、双碱基重复 SSR、三碱基重复 SSR、四碱基重复 SSR、五碱基重复 SSR、六碱基重复 SSR。这六种类型 SSR 设置的参数分别是重复 10、6、5、5、5 和 5 次。

1.6 萜类合成相关基因的分析

利用欧洲红豆杉 (*Taxus baccata* L.) 紫杉醇生物合成关键酶—紫杉二烯合成酶 (Taxadiene synthase gene, TbTS) 蛋白质的氨基酸序列对本地穗花杉转录组进行 TBLASTN 分析^[13]。比对参数为 E 值 $< 1e^{-25}$ 。

2 结果与分析

2.1 测序和从头组装

利用 Illumina HiSeq2500 技术对穗花杉茎叶进行转录组测序后, 获得了 32 321 978 个 reads 片段, 包含了 8 141 132 186 个核苷酸序列信息。质量值 $Q \geq 30$ 碱基数占所有 read 的碱基数的比例即 Q30%

为 89.91%。穗花杉转录组测序共得到约 8.14 Gb 的 clean data, 组装得到 4 898 457 条序列重叠群 (Contig), 总长度约为 261 826 164 bp, 平均长度及 N50 分别为 53.45 bp 和 48 bp。进一步对 Contigs 进行拼接后, 共获得 82 884 条 Unigene 序列和 140 286 条 Transcript 序列, 总长度为分别为 55 775 850 bp 和 143 129 259 bp, 平均长度为 673 bp 和 1 020 bp, N50 的长度为 1 314 bp 和 1 932 bp。长度大于 1 000 bp 的 Unigene 和 Transcript 序列分别占到 18.14% 和 34.39% (表 1)。

表 1 穗花杉转录组从头组装结果统计

Table 1 The statistical result of de novo assembly of *A. argotaenia* transcriptome

Length Range	Contig	Transcript	Unigene
200 ~ 300	43 871 (0.90%)	43 593 (31.07%)	37 524 (45.27%)
300 ~ 500	22 709 (0.46%)	26 027 (18.55%)	19 081 (23.02%)
500 ~ 1 000	13 501 (0.28%)	22 426 (15.99%)	11 247 (13.57%)
1 000 ~ 2 000	9 636 (0.20%)	25 925 (18.48%)	8 724 (10.53%)
2 000 +	4 045 (0.08%)	22 315 (15.91%)	6 308 (7.61%)
Total Number	4 898 457	140 286	82 884
Total Length	261 826 164	143 129 259	55 775 850
N50 Length	48	1 932	1 314
Mean Length	53.45	1 020	673

2.2 功能注释

为了能够直观地研究穗花杉转录组信息, 将所拼接得到的 82 884 条 unigene 分别与 NR、Swiss-Prot、GO、COG、KOG、KEGG 数据库进行比对分析。结果显示, 共有 27 495 条 unigene 至少被一个数据库注释, 占 unigene 总数的 30.14% (表 2)。

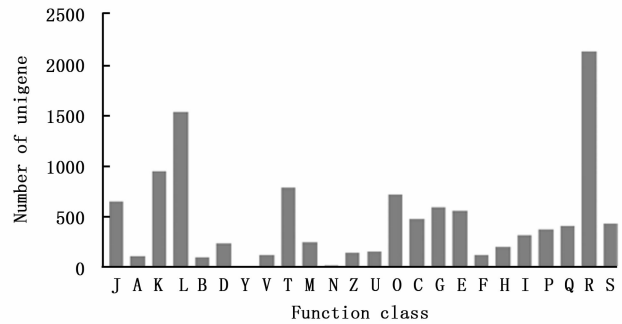
表 2 穗花杉 unigene 功能注释统计

Table 2 The statistical result of functional annotation of *A. argotaenia* unigenes

Anno_Database	Annotated_Number	300 ≤ length < 1 000	length ≥ 1 000
COG_Annotation	8 206	1 673	5 517
GO_Annotation	13 453	3 726	7 154
KEGG_Annotation	5 145	1 154	3 330
KOG_Annotation	15 694	4 590	8 056
Pfam_Annotation	16 816	4 124	10 810
Swissprot_Annotation	17 575	5 299	9 464
nr_Annotation	26 996	8 499	13 002
All_Annotated	27 495	8 704	13 037

利用 COG 数据库对得到的 82 884 条穗花杉 unigene 进行功能注释, 其中被注释到的 unigene 一共有 8 206 条, 分别被注释到 24 个 COG 分类中。其中, “一般功能基因” (General function prediction only)、“复制、重组和修复” (Replication, recombination

and repair) 和“转录” (Transcription) 是最大的 3 个类群, 分别有 2 141、1 534 和 951 条 unigene。然而, “核结构” (Nuclear structure) 是最小的类群, 只有 1 条 unigene (图 1)。



J: 翻译, 核糖体结构和生物合成; A: RNA 加工和修饰; K: 转录; L: 复制, 重组和修复; B: 染色体的结构和动态; D: 细胞周期控制, 细胞分裂, 染色体分离; Y: 核结构; V: 防御机制; T: 信号转导机制; M: 细胞壁/膜/胞外被膜; N: 细胞运动; Z: 细胞骨架; U: 细胞内运输, 分泌和囊泡运输; O: 翻译后修饰, 蛋白质折叠, 分子伴侣; C: 能量产生和转换; G 碳水化合物的运输和代谢; E: 氨基酸的运输和代谢; F: 核苷酸的运输和代谢; H: 辅酶的运输和代谢; I: 脂质的运输和代谢; P: 无机盐的运输和代谢; Q: 次生代谢物的生物合成、运输及分解代谢; R: 一般功能预测; S: 功能未知。

J: Translation, ribosomal structure and biogenesis; A: RNA processing and modification; K: Transcription; L: Replication, recombination and repair; B: Chromatin structure and dynamics; D: Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning; Y: Nuclear structure; V: Defense mechanisms; T: Signal transduction mechanisms; M: Cell wall/membrane/envelope biogenesis; N: Cell motility; Z: Cytoskeleton; W: Extracellular structures; U: Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport; O: Posttranslational modification, protein turnover, chaperones; C: Energy production and conversion; G: Carbohydrate transport and metabolism; E: Amino acid transport and metabolism; F: Nucleotide transport and metabolism; H: Coenzyme transport and metabolism; I: Lipid transport and metabolism; P: Inorganic ion transport and metabolism; Q: Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism; R: General function prediction only; S: Function unknown.

图 1 穗花杉转录组 Unigene 的 COG 功能聚类

Fig. 1 COG function classification of the unigenes in *A. argotaenia* transcriptome

对 82 884 条 unigene 进行 GO 功能注释表明, 其中有 13 453 条 unigene 分别注释到 51 个功能组, 归纳为生物学过程 (Biological Process)、细胞组分 (Cellular Component) 和分子功能 (Molecular Function) 三大部分, 分别含有 20、16 及 15 个功能组。在生物学过程部分中, 差异表达基因在代谢过程 (metabolic process) 和细胞过程 (cellular process) 功能组中注释

的 unigene 数目最多,分别为 8 846 和 7 206 条;在细胞组分部分中,细胞部分 (cell part) 和细胞 (cell) 功能组差异基因数目最多,分别为 5 609 和 5 551 条;

在分子功能部分中,催化活性 (catalytic activity) 和结合 (binding) 功能组分别含有 6 989 和 6 676 条 (图 2)。

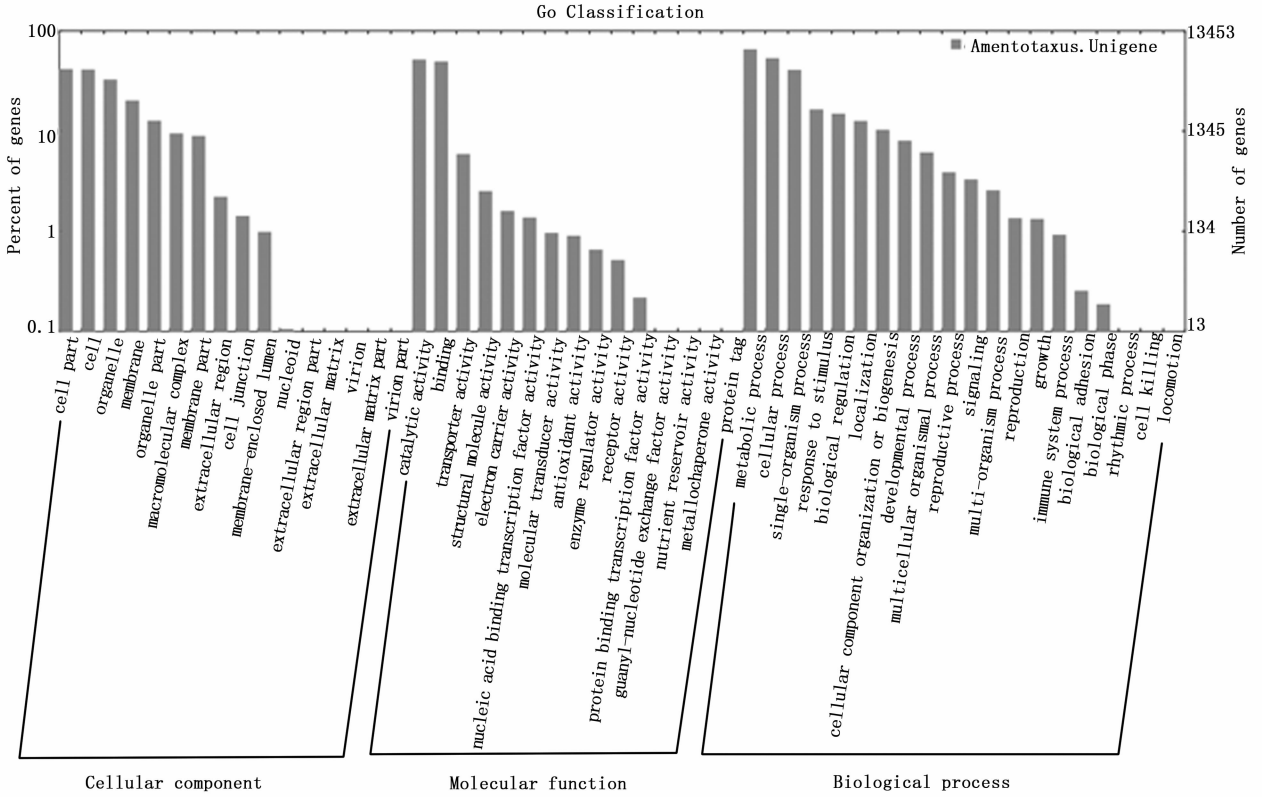


图 2 穗花杉转录组的 Unigene GO 功能分类

Fig. 2 Gene Ontology of the uUnigenes in *A. argotaenia* transcriptome

为了能够把穗花杉的基因信息作为一个整体的网络进行研究,我们利用 KEGG 数据库对穗花杉转录组进行分析。其中,代谢途径 (ko01100) 和次生代谢生物合成 (ko01110) 中的 unigene 数最多,分别为 1 477 和 664 条,这为查找特定次生代谢途径中的基因提供了很好的基础。

2.3 SSR 分析

利用 MISA 软件搜索穗花杉的 15 032 条 Unigene, 共在 2 420 条 unigene 中搜索到 2 827 个 SSRs 位点。具有 1 个以上 SSRs 的 unigene 是 339 条。单核苷酸重复 SSR 出现频率最高 (60.1%), 其次为三核苷酸 (25.4%) 和二核苷酸 (12.5%)。其它三种类型的都很少: 四核苷酸 (0.9%)、五核苷酸 (0.6%)、六核苷酸 (0.5%) (表 3)。

2.4 萜类合成相关基因分析

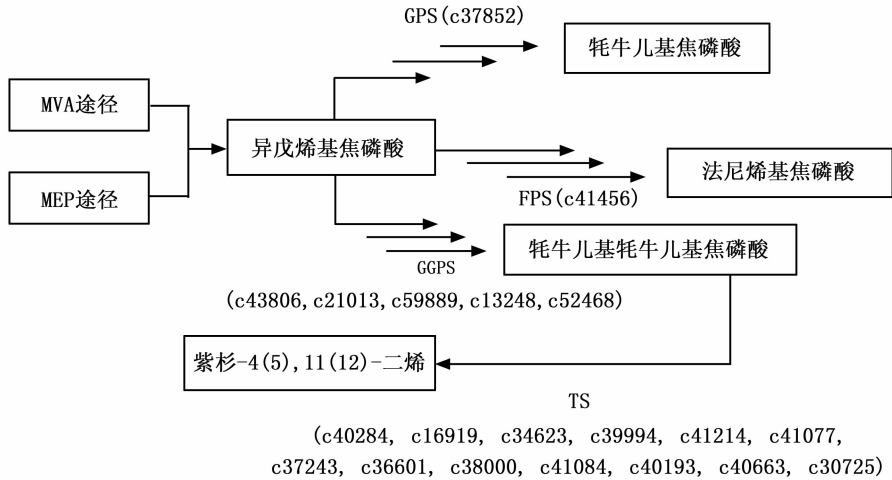
利用 KEGG 通路中的基因信息查找被 KEGG 数据库注释的穗花杉 unigene, 获得牻牛儿基焦磷酸合

表 3 穗花杉 SSR 位点分析

Table 3 The analysis of SSR site of *A. argotaenia*

Motif Length	Repeat Numbers							Total	%
	5	6	7	8	9	10	>10		
Mono	-	-	-	-	-	894	805	1 699	60.1
Di	-	191	71	29	20	16	25	352	12.5
Tri	464	160	70	21	2	-	1	718	25.4
Tetra	22	3	-	1	-	-	-	26	0.9
Penta	15	1	1	-	-	-	-	17	0.6
Hexa	7	4	3	1	-	-	-	36	0.5
Total	508	359	145	52	22	910	831	2 827	
%	18.0	12.7	5.1	1.8	0.8	32.2	29.4		

成酶 (GPS)、法尼基焦磷酸合成酶 (FPS) 和牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶 (GGPS) 的同源基因, 分别为 1、1 和 5 个 (图 3)。利用紫杉二烯合成酶 TbTS 基因序列对穗花杉本地转录组进行 BLAST 分析, 得到 13 个同源基因, 这为今后进一步验证穗花杉中是否存在紫杉二烯合成酶提供了基因基础 (图 3)。



GPS: 牻牛儿基焦磷酸合成酶; FPS: 法尼烯基焦磷酸; GGPS: 牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸

GPS: Geranyl pyrophosphate synthase; FPS: Farnesyl pyrophosphate synthase; GGPS: Geranylgeranyl pyrophosphate synthase

图3 穗花杉萜类合成通路关键基因查找结果

Fig. 3 The result of key genes of terpene biosynthesis pathway in *A. argotaenia*

3 讨论

树木的基因组较大,测一个基因组需要较高的成本。而且树木的染色体构型较为复杂,除了成本问题,在染色体拼接方面也存在巨大的挑战。随着测序技术的发展,转录组测序已经越来越普遍,也为进一步探测基因组研究缺乏物种功能基因组变化的网络模式提供条件^[14]。在红豆杉科中,红豆杉属、榧树属中的香榧都有转录组测序^[15-16]。红豆杉属中的物种不仅有组织和细胞系的转录组测序,还有激素处理后的转录组测序^[17]。然而,穗花杉属中的穗花杉的基因数据比较匮乏,本研究利用 HiSeq2500 对穗花杉的茎叶混合样品进行转录组测序,共获得 82 884 条 unigene 和 140 286 条 transcript。其中,有 27 495 条 unigene 得到注释,研究结果为穗花杉的遗传基础研究提供了基因层面的数据。

穗花杉在分类学上具有很高的学术价值。自发现以来,它的分类归属一直是植物学家争论的问题。研究者从植物形态学、胚胎学、解剖学、孢粉学和植物化学等方面对穗花杉的系统分类地位进行了广泛的研究。多数学者认为穗花杉具有红豆杉科某些共同特征,与三尖杉科关系密切,是红豆杉与三尖杉科之间联系的桥梁^[2]。但是,少有研究者从分子遗传层面研究穗花杉的系统分类地位。仅有管启良等^[18]对穗花杉染色体层面对穗花杉的系统分类地位进行了研究,得出结论归于罗汉松科。本研究

利用高通量测序技术对穗花杉转录组测序,得到大量基因数据,为以后深入研究穗花杉的系统分类打下基础。

穗花杉属缺乏足够的遗传背景,Ge 等^[1]只利用 ISSR 技术对穗花杉属的各个种之间的遗传多样性和群体结构进行分析。虽然 ISSR 引物通用性好,但是得到的多态性位点有限。在本研究中,我们在穗花杉转录组数据中一共预测到 2 827 个 SSR 位点,远远高于 ISSR 通用引物数,为以后 SSR 位点的开发提供了遗传基础。SSR 位点的多态性也为生物遗传多样性的研究提供了一个重要的手段。

紫杉醇是一个重要的萜类化合物,最早是在紫杉树皮中发现的。穗花杉属是红豆杉科的一个属,是否能够合成紫杉醇依然未知。根据植物化学系统学概念,在红豆杉科中的穗花杉属植物里面也可能具有紫杉醇。穗花杉转录组功能注释得到 5 个 GGPS 基因,还有 20 个跟二萜生物合成通路基因。紫杉二烯合酶是紫杉醇合成过程中一个重要的限速酶,只要穗花杉中存在紫杉二烯合酶(Taxadiene synthase, TS)基因,那么就为证明穗花杉可以合成紫杉醇提供了重要的证据。对本地穗花杉转录组数据进行 TBLASTN 分析,预测到的 30 个 unigene。为以后的验证穗花杉是否能够合成紫杉醇提供了候选基因。

4 结论

本研究通过穗花杉转录组测序共获得 82 884

条 unigene, 有 27 495 条 unigene 得到注释, 其中有近 20 个 unigene 与萜类合成途径有关, 为以后该物种萜类合成途径研究, 特别是紫杉二烯合成酶编码基因的研究打下了基础, 也为穗花杉系统分类地位的研究提供新的遗传信息。另外, 在穗花杉转录组数据中, 我们一共预测到 2 827 个 SSR 位点, 这为今后穗花杉 SSR 位点的开发与遗传多样性评估提供了有用的分子标记。

参考文献:

- [1] Ge X J, Zhou X L, Li Z C, *et al.* Low genetic diversity and significant population structuring in the relict *Amentotaxus argotaenia* complex (*Taxaceae*) based on ISSR fingerprinting[J]. *Journal of Plant Research*, 2005, 118(6): 415 - 422.
- [2] 何 飞, 刘兴良, 马钦彦, 等. 珍稀濒危植物穗花杉的研究进展[J]. *四川林业科技*, 2007, 28(6): 31 - 38.
- [3] 孙同兴, 林金星. 中国特有植物穗花杉的生物学特性及其保护[J]. *广西植物*, 1996, 16(4): 353 - 358.
- [4] Pilger R. *Taxaceae* in Engler's[J]. *Das Pflanzenreich*, 1903.
- [5] Pilger R. *Gymnospermae* in Engler A. and Prantl K[M]. *Die Natrill Pflanzenfamilien*. 2nd, 1926, 13: Leipzig.
- [6] Kudo Y, Yamamoto Y. *Amentotaxaceae*[J]. *Mater. Fl. Formosa IV Soc Trop Agric*, 1931, 3: 110 - 111.
- [7] Florin R. Evolution in cordaites and conifers[J]. *Acta Horti Bergiani*, 1951, 15: 285 - 388.
- [8] 马忠武, 何关福, 印万芬. 双黄酮成分在红豆杉科各属、种中的分布[J]. *中国科学院大学学报*, 1985, 23(3): 192 - 195.
- [9] Grabherr M G, Haas B J, Yassour M, *et al.* Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome[J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(7): 644 - 652.
- [10] Xie C, Mao X, Huang J, *et al.* KOBAS 2.0: a web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(suppl 2): W316 - W322.
- [11] Eddy S R. Profile hidden Markov models[J]. *Bioinformatics*, 1998, 14(9): 755 - 763.
- [12] Finn R D, Bateman A, Clements J, *et al*[M]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42: D222 - 230.
- [13] Köksal M, Jin Y, Coates R M, *et al.* Taxadiene synthase structure and evolution of modular architecture in terpene biosynthesis[J]. *Nature*, 2011, 469(7328): 116 - 120.
- [14] Leung R K K, Dong Z Q, Sa F, *et al.* Quick, sensitive and specific detection and evaluation of quantification of minor variants by high-throughput sequencing[J]. *Molecular BioSystems*, 2014, 10(2): 206 - 214.
- [15] Hao D C, Ge G B, Xiao P G, *et al.* The first insight into the tissue specific taxus transcriptome via Illumina second generation sequencing[J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e21220.
- [16] 易官美, 包燕春. 香榧转录组测序及生物信息学基础分析[J]. *山东农业大学学报: 自然科学版*, 2016, 47(1): 19 - 24.
- [17] Qiu D, Pan X, Wilson I W, *et al.* High throughput sequencing technology reveals that the taxoid elicitor methyl jasmonate regulates microRNA expression in Chinese yew (*Taxus chinensis*) [J]. *Gene*, 2009, 436(1): 37 - 44.
- [18] 管启良, 俞仲轺. 穗花杉染色体的研究[J]. *植物分类与资源学报*, 1993(4): 385 - 391.

(责任编辑: 张 研)