

## RNA-Seq技术在珍稀濒危植物研究中的应用进展

倪馨宇<sup>1,2</sup> 贺俊英<sup>1,2</sup> 燕孟娇<sup>3</sup> 杜超<sup>1,2\*</sup>

(1. 内蒙古师范大学生命科学与技术学院, 呼和浩特 010022; 2. 内蒙古自治区高等学校生物多样性保护与可持续利用重点实验室, 呼和浩特 010022; 3. 内蒙古自治区农牧业科学院植物保护研究所, 呼和浩特 010031)

**摘要** 珍稀濒危植物是自然界当中的重要植物资源, 对研究植物系统进化、生态环境恢复、植物抗逆生理、挖掘优异抗逆基因等方面具有重要意义, 但大部分珍稀濒危植物的遗传信息缺乏, 严重制约了其保护和利用工作的开展。珍稀濒危植物的基因组较大、基因信息复杂、遗传背景不清晰, 因此对其进行基因组测序相对困难, 而RNA-Seq技术拥有可以对无参基因组物种直接进行测序的优势, 近年来在珍稀濒危植物的研究中得到青睐。文章简介了RNA-Seq技术, 综合近年研究总结了RNA-Seq技术在珍稀濒危植物抗逆机制、次生代谢、生长发育调控及分子标记开发4个主要应用方向的研究进展。此外, 还对RNA-Seq技术在珍稀濒危植物研究中的应用前景进行了展望, 同时在此基础上提出珍稀濒危植物转录组新研究思路的可能性。

**关键词** 转录组测序技术; 珍稀濒危植物; 抗逆机制; 次生代谢

中图分类号: Q94 文献标志码: A doi: 10.7525/j.issn.1673-5102.2023.04.001

## Application Progress of RNA-Seq Technology in Rare and Endangered Plants

NI Xinyu<sup>1,2</sup> HE Junying<sup>1,2</sup> YAN Mengjiao<sup>3</sup> DU Chao<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Inner Mongolia Normal University, Hohhot 010022; 2. Key Laboratory of Biodiversity conservation and Sustainable utilization for College and University of Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot 010022; 3. Inner Mongolia Academy of Agricultural & Animal Husbandry Sciences, Hohhot 010031)

**Abstract** Rare and endangered plants are important plant resources in nature, and play a key role in the study of plant phylogeny, ecosystem restoration, plant stress resistance physiology, and the excavation of stress-resistance genes. However, the lack of genetic information has severely restricted the conservation and utilization in most endangered plant. Due to the large genomes, complex genetic information, and unclear genetic backgrounds of endangered plants, it is relatively difficult to sequence the genomes of endangered plants. In recent years, RNA-Sequencing could directly sequence non-reference genomic species, what makes it to be widely used in the study of endangered plants. In addition, this paper presented the prospect of the application of RNA-Sequencing technology in the study of endangered plants and suggested the new ideas of transcriptome using in the endangered plants in future.

**Key words** RNA-Sequencing; endangered plants; stress response; secondary metabolism

中国是世界上野生植物资源受到威胁和破坏较为严重的国家之一, 据统计, 中国高等植物中达到灭绝等级的物种为52种, 受威胁物种为3767种, 其中包括本土物种2462种<sup>[1]</sup>。珍稀濒危植物的特殊性与重要性决定了其种质资源的宝贵, 它们的药用、生态、育种、观赏等价值不可小觑。目

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目(2019LH03005); 内蒙古师范大学引进高层次人才科研启动经费项目(2018YJRC014)

第一作者简介: 倪馨宇(1998—), 女, 硕士研究生, 主要从事植物逆境生理及分子生物学研究。

\* 通信作者: E-mail: duchao@imnu.edu.cn

收稿日期: 2022-09-26

Foundation item: Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region(2019LH03005); High-level Scientific Research Foundation for the Introduction of Talent of Inner Mongolia Normal University(2018YJRC014)

First author introduction: NI Xinyu(1998—), female, postgraduate, majoring in the research of physiological and molecular biology of plant stress.

\* Corresponding author: E-mail: duchao@imnu.edu.cn

Received date: 2022-09-26

前,大部分珍稀濒危植物的物种基因组信息极度匮乏,遗传资源严重流失,这极大地影响了珍稀濒危植物的保护与利用,因此珍稀濒危植物的遗传信息急需被深入研究和开发利用。

随着核酸序列测序技术的提高,基于第二代测序的RNA-Seq技术已被证明是研究非模式生物一种高效和经济的方法。对于绝大部分物种为非模式种的珍稀濒危植物来说, RNA-Seq技术拥有无需使用待测物种已建立的基因组数据库便可获得全部转录本信息的绝对优势,可以揭示植物在不同生长状态下的调控机制,包括逆境胁迫响应、生长发育调控、次生代谢途径等。

近几年,第三代测序技术在历经多代更迭后性能逐渐趋于优化和稳定,相比二代测序,三代测序利用光学、纳米技术取得了超长读长、无PCR偏向性、实时测序等优势,同时可以检测基因组表观修饰与结构变异等位点,已被认为是进行基因组序列组装的理想选择,其中基于三代测序技术的全长转录组测序(Iso-Seq)是相关研究者当前用于未知物种进行从头测序组装研究的优先选择方法<sup>[2-3]</sup>。RNA-Seq技术对珍稀濒危植物的研究具有重要意义,从多维度深入挖掘个体或种群生物学意义的多组学整合研究也在近年来极力推进了各植物物种的功能基因组学研究发展,使得多组学整合分析与Iso-Seq两者同RNA-Seq技术的结合可能对了解珍稀濒危植物的遗传信息,实现珍稀濒危植物资源的科学保护与可持续开发利用的前景提供进一步的重要帮助。

## 1 RNA-Seq技术的发展与内容

2003年人类基因组计划顺利完成,也同时标志着分子研究正式迈入后基因组时代,转录组学、蛋白质组学、代谢组学等功能组学相继聚集了科研工作者的目光并被加以创新和应用。其中转录组学因入手简单、针对性强、覆盖面广等明显优势,率先成为功能组学中的领先者。转录组学是从整体水平上研究细胞中基因的转录调控规律,发现生物个体在特定时刻或特定组织下基因表达情况,从而揭示特定生物学过程的一门学科<sup>[4]</sup>。与基因组不同,转录组即使在正常的生命活动(如细胞分裂、分化)中也会做出响应,使转录水平上相关基因表达量发生迅速且明显的变化<sup>[5]</sup>。因此探索目标生物的基因功能时,可在转录水平上,通过

对比基因在不同时间、空间或干扰程度的表达水平,来了解其编码蛋白质的活性,以及发现相关的调控机制及更广泛的信号通路和生化途径的线索。自1996年转录组学这一概念提出后,次年Velculescu等<sup>[6]</sup>利用Sanger测序技术对酿酒酵母细胞开展首次转录组测序试验,同时提出将转录组测序应用于分析真核生物的正常、发育和疾病等状态下基因功能信息的预想。随着科技的发展进步,DNA芯片、基因表达系列分析(SAGE)、大规模平行测序技术(MPSS)等转录组研究技术不断涌现,但因操作复杂、准确度低、价格昂贵等限制因素未得到广泛使用<sup>[7]</sup>。伴随研究需求的愈加提高,2005年以瑞士Roche454为开端的二代测序平台正式迈入全球市场,随后众多二代测序技术平台纷纷上市,如美国Illumina GA、HiSeq、ABI SOLiD,中国华大BGISEQ、DNBSEQ等。十多年来二代测序技术的不断完善与革命性进步,推动着转录组测序发展成为最具应用市场与发展势头的研究方法。

目前,基于二代测序的转录组测序方法统称为RNA-Seq技术。该技术将收集的待测样本总RNA经片段化后反转录合成cDNA,进行末端修复和连接接头后再通过PCR富集到目标丰度,接着在测序平台上机测序,测序完成后将测序仪产生的原始数据进行整理,进一步展开序列数据的生物信息学分析(图1)。相较于DNA芯片、SAGE和MPSS技术, RNA-Seq技术不仅具有高读长、高通量、高准确性的特点,且它的动态检测范围更宽,分辨水平能够达到单核苷酸,不存在杂交技术中荧光信号产生的交叉反应问题<sup>[8]</sup>。在检测过程中, RNA-Seq技术可以及时发现新基因,方便捕获基因融合、可变剪接、简单重复序列(SSR)、单核苷酸多态性(SNP)等特征位点。最值得注意的是, RNA-Seq技术不局限于检测已有基因组信息的物种,在测序过程中无需预先设计探针,对于没有参考基因组或参考转录本的物种,测序得到的reads会进行重新组装,生成可直观表现每个基因的转录结构及转录表达水平的转录图谱,提供更精准可观的数字化信号<sup>[9]</sup>。如今RNA-Seq技术已广泛应用在各领域学科研究中,其中植物转录组学研究主要集中应用于新基因的挖掘、分子标记的开发、基因家族鉴定及进化分析、转录图谱绘制、代谢途径确定等方面,为研究目标基因表达模式、鉴别差异基因、发展分子标记等提供了大量有效数据。

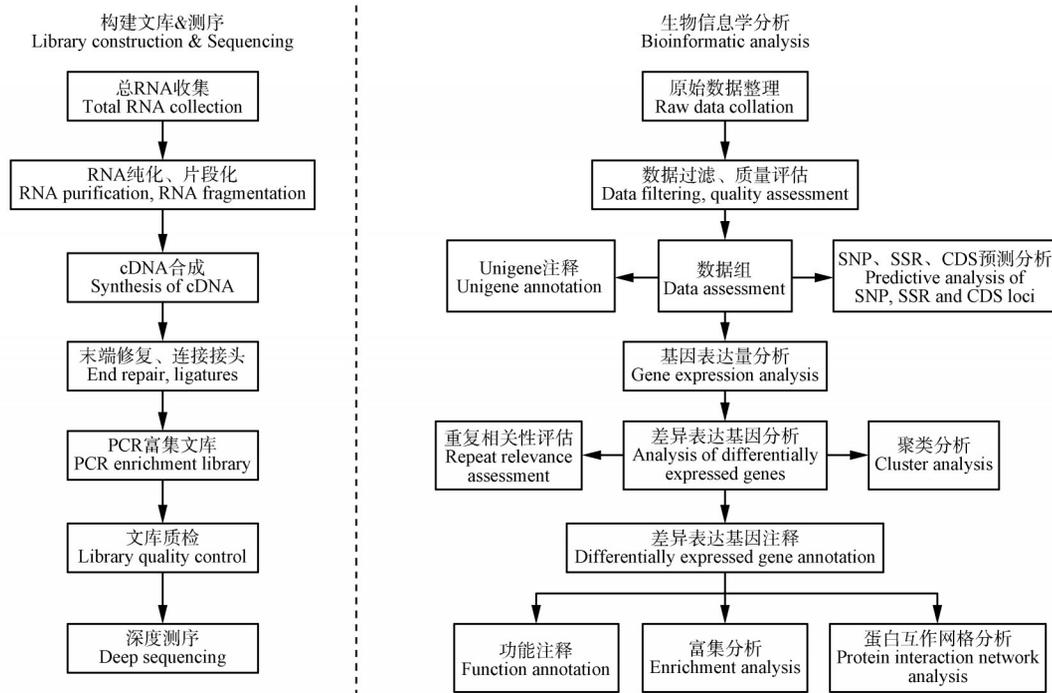


图1 RNA-Seq主要技术路线及分析流程

Fig.1 Main technical route and analysis process of RNA-Seq

## 2 RNA-Seq技术在珍稀濒危植物研究中的应用

珍稀濒危植物大多物种古老,遗传背景复杂、基因杂合性高,因此对此直接进行基因组测序研究存在不少技术难关和空白。相对而言,转录组测序技术的完成度和准确度更高,目前已利用RNA-Seq技术对多种珍稀濒危植物完成了测序,如蒙古沙冬青(*Ammopiptanthus mongolicus*)、长叶红砂(*Reaumuria trigyna*)、铁皮石斛(*Dendrobium catenatum*)等。RNA-seq技术推动了珍稀濒危植物在分子水平进行保护与开发工作的研究进展(图2),为深入探索珍稀濒危植物的抗逆机制、生长发育调控、次生代谢途径、分子标记开发等方面奠定了基础。

### 2.1 在抗逆机制中的应用

大部分珍稀濒危植物在地势严峻、气候极端的自然条件下繁衍进化,因生存环境极端恶劣,所遭受的生物胁迫(如虫害、杂草危害等)较少,但会经常遭受盐、干旱、温度、紫外线(UV)等多种非生物胁迫<sup>[10]</sup>。珍稀濒危植物在长期响应这种恶劣生境的过程中,其形成了独特的抗逆机制,是深入研究植物抗逆机理、挖掘抗逆基因资源的优良材料。在研究珍稀濒危植物的抗逆机制过程中,可以利

用RNA-Seq技术对珍稀濒危植物进行转录组测序,通过比对各大数据库的已知序列,将获得的数据进行基因功能注释,筛选差异表达基因(DEGs),搭建待测植物转录组信息平台,筛选与逆境响应有关序列,从而挖掘珍稀濒危植物中的次生代谢通路、关键酶、信号转导机制以及功能基因等抗逆途径(图3)。Li等<sup>[11]</sup>应用Illumina HiSeq 2000测序平台进行转录组双末端测序来分析生活于沿海地区的濒危植物北沙参(*Glehnia littoralis*)的耐盐机制,经de novo拼接获得105 875条Unigenes,共鉴定出10 335条DEGs,发现了可能在北沙参的耐盐应答中发挥作用的151个转录因子及524条参与植物激素信号转导通路和30条参与Ca<sup>2+</sup>信号转导有关的Unigenes。藏边大黄(*Rheum australe*)生长于喜马拉雅山脉高海拔地区,长期适应于极端环境,了解藏边大黄对极寒强光的适应机制具有重要生态价值。Mala等<sup>[12]</sup>对自然生境下与4℃、25℃培养环境下的藏边大黄进行转录组研究,发现了组氨酸蛋白激酶与细胞壁连接类受体激酶可能通过参与控制藏边大黄体内的细胞分裂素和乙烯的合成信号,以及果胶的跨膜运输来达到维持冷刺激下平衡细胞内外渗透压的目的,超氧化物歧化酶、谷胱甘肽-S-转移酶等几种抗氧化酶则减少藏边大黄在极端环境中体内活性氧过

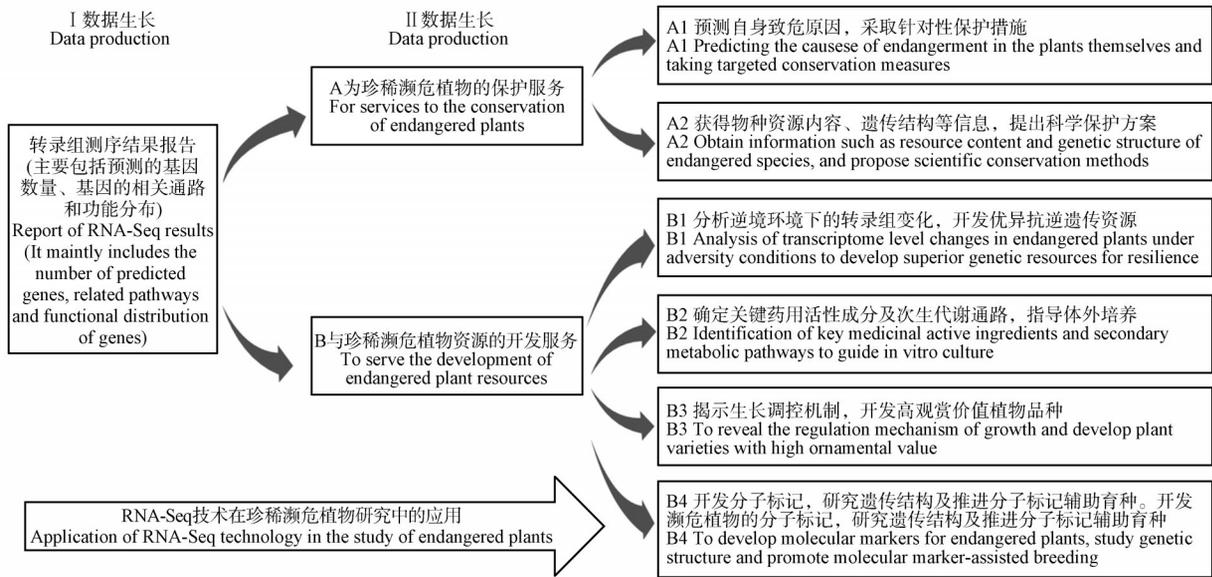


图2 珍稀濒危植物的RNA-Seq技术应用现状

Fig.2 Application status of RNA-Seq technology in rare and endangered plants

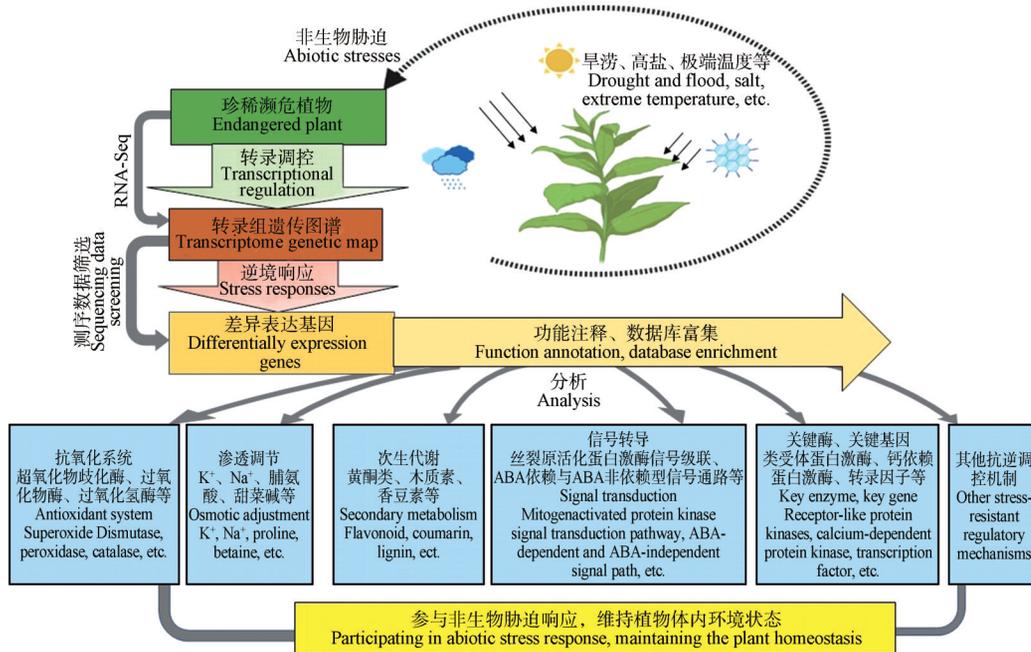


图3 珍稀濒危植物抗逆机制的RNA-Seq研究框架

Fig.3 Framework for RNA-Seq technology on stress resistance mechanisms in rare and endangered plants

量而受到的伤害,赤霉素、脱落酸、乙烯、油菜素内酯和生长素的调控机制则帮助了藏边大黄在其生态位的适应性,另外酚类物质、木质素的次级代谢可能与藏边大黄适应强UV环境也有着密切关系。在利用转录组数据分析珍稀濒危植物抗逆机制的后期,针对性挖掘物种功能基因,进一步开发优异的抗逆遗传资源。Sun等<sup>[13]</sup>基于新疆沙冬青(*Am-mopiptanthus nanus*)的干旱胁迫转录组数据,分离

得到一个与拟南芥 *DHN* 基因高度同源的 *AnDHN* 基因,将此基因在拟南芥中进行过表达发现,转基因拟南芥的根系结构、保水性能、渗透调节能力、活性氧清除能力、抗旱性及耐盐性均显著提高,表明于新疆沙冬青中得到的 *AnDHN* 基因可能是提高作物非生物胁迫耐性的优异候选基因。除此之外,还有华石斛(*Dendrobium sinense*)、白梭梭(*Haloxylon persicum*)等其他珍稀濒危物种的逆

境适应机制已被初步揭示(见附表)<sup>[14-19]</sup>。大量研究报道均说明RNA-Seq技术能够快速且准确预测植物对逆境适应的相关因子,更多珍稀濒危植物物种适应逆境的特殊机制正被揭示,关键功能基因也正逐渐被提取克隆,这对植物逆境生物学领域与抗逆作物品种选育研究领域有着至关重要的意义。

## 2.2 在次生代谢中的应用

植物的次生代谢发生在植物体的整个生命活动周期中,许多来自植物次生代谢产物的活性化合物经常作为药类成分的重要来源而被广泛提取和使用,但由于许多药用植物种群数量原本稀少或者人类过度开采导致减少,使得濒临灭绝的药用植物种类在连年增长。利用RNA-Seq技术可以获得濒危药用植物的转录本信息,通过KEGG、GO富集等分析方法,确定活性化合物代谢通路,同时挖掘其中的相关调控基因和关键酶。Poursalavati等<sup>[20]</sup>通过分析伊朗本土濒危药用植物*Dracocephalum kotschyi*的转录本数据,系统明确了该植物中含有的高价值次生代谢物甲氧基黄酮的合成途径。Vashisht等<sup>[21]</sup>分析胡黄连(*Picrorhiza kurroa*)转录组数据发现了10个能够通过结合基因或受环境影响而调控胡黄连糖甙积累过程的转录因子,这一发现为制定酶和转录因子联合的方法提高体外培养胡黄连中胡黄连糖甙的产量提供了重要帮助,也意味着RNA-Seq技术对人工调控活性化合物的代谢通路,保障濒危药用植物资源可持续再生及体外合成活性化合物等具有重要意义。另外,一些研究同样表明,植物的次生代谢产物对植物自身适应环境的生存能力有着直接的助益,RNA-Seq技术同样揭示了珍稀濒危植物在应对生存压力时次生代谢产物的重要性。珍稀泌盐植物长叶红砂(*Reaumuria trigyna*)是一种生长于我国阿拉善-西鄂尔多斯地区的濒危小灌木,Dang等<sup>[22]</sup>对比了盐胁迫处理前后的长叶红砂转录组数据,发现苯丙烷类和黄酮类生物合成途径的代谢通路及相关代谢产物可能在长叶红砂于高盐状态下维持自由基平衡和膜完整起到了重要作用。除上述几个物种外,还在奇南沉香(*Aquilaria malaccensis*)、海南粗榧(*Cephalotaxus hainanensis*)等珍稀濒危植物的次生代谢研究中取得了显著成果(见附表)<sup>[23-28]</sup>。通过研究表明,基于NGS的RNA-Seq技术可以在缺乏物种基因组信息的情况下研究珍稀

濒危植物的重要次生代谢途径相关基因的表达变化情况,对深入理解珍稀濒危植物在应对环境压力时的次生代谢调控机理发挥了重要作用;并且通过与生化、医药等学科的结合,在近10年中帮助濒危药用植物的探索取得了许多重要研究成果,对未来濒危药用植物的育种扩繁计划提供了新的设计思路。

## 2.3 在生长发育调控进程中的应用

植物体的生长缓慢、结籽困难、花药败育、种子休眠等自身生物学特性障碍是造成种群数量少、种群难以进行修复和更新,导致物种处于濒危状态的主要原因之一。利用RNA-Seq技术对植物生长某一阶段的组织、器官或个体进行测序,通过各大数据库进行序列富集/注释,分析DEGs,挖掘关键基因或通路,进而针对性地找出导致濒危的主要因素。金线兰(*Anoectochilus roxburghii*)种子极细小且胚发育不完整,在野外必须依靠与真菌共生来萌发,这是金线兰有性繁殖困难的最主要原因。Liu等<sup>[29]</sup>对金线兰的共生与非共生种子进行了转录组测序,筛选出11 881条显著表达的DEGs,发现其中有6条赤霉素介导的GA-GID1-DELLA信号通路相关基因,表明这6条基因的表达受到了菌根真菌的诱导,可能在金线兰种子共生萌发过程中发挥着重要功能。珙桐(*Davidia involucrat*)的种子多败育是其种群数量稀少的关键原因,Li等<sup>[30]</sup>在Illumina HiSeq 2500平台对正常种子与败育种子进行转录组测序分析,通过分析DEGs,推断珙桐种子的败育与母本控制的珠被发育有着密切的联系,而MYB转录因子、WRKY转录因子,受体蛋白激酶以及漆酶是此过程中重要的调控因子。Liu等<sup>[31]</sup>通过分析濒危植物掌叶木(*Handeliidendron bodinieri*)的雌性和雄性花的转录组测序数据,在3个不同花期鉴定出的调控掌叶木雄蕊败育的差异表达转录本中发现了14个与花药发育以及减数分裂相关的基因,包括*HbGPAT*、*HbAMS*、*HbLAP5*、*HbLAP3*、*HbTES*、*HbMLS*等。以及在其他珍稀物种刺五加(*Eleutherococcus senticosus*)<sup>[32]</sup>和黄牡丹(*Paeonia lutea*)<sup>[33]</sup>的研究中也取得了相应突破(见附表)。部分珍稀濒危植物因外观在自然状态下长势奇特使其具有极高的观赏价值,如花色变异、叶形变异等性状,RNA-Seq技术在帮助探究此类观赏性濒危植物外观发生变异的生长调控机制中同样发挥了重要作用。带叶兜兰

(*Paphiopedilum hirsutissimum*) 是著名的观赏性濒危植物, Li 等<sup>[34]</sup>发现编码 F3H 的 2 个基因以及编码 CHS 的 1 个基因严重下调, 致使花青素积累量降低, 从而导致了带叶兜兰白化瓣表型特征的出现。蒋景龙等<sup>[35]</sup>为探究濒危观赏植物秦岭石蝴蝶(*Petrocosmea qinlingensis*) 的花器发育调控机制, 应用 Illumina HiSeq 2500 平台对正常花朵与变异花朵进行转录组测序, 经过 NR 比对、GO 富集等分析方法, 发现秦岭石蝴蝶的花朵变异与植物激素信号转导、苯丙烷生物合成、类黄酮生物合成等 7 个通路相关, 并确定了 *PqMIF2*、*PqMYB340*、*PqMYB305*、*PqGATA12*、*PqCCD4* 和 *PqZBED* 6 个与秦岭石蝴蝶花器发育相关的基因。研究证实, 通过 RNA-Seq 技术能够在珍稀濒危植物中高效筛选出调控发育关键基因, 在阐释植物体特化性状的形成原因和遗传规律等方面提供了大量理论支持。

#### 2.4 在分子标记中的应用

近年来分子标记技术的发展愈加完善, 使用其获得物种遗传信息、评估遗传资源结构等, 并提出相关保护方案, 是研究珍稀濒危植物遗传多样性的常用方法。大多数珍稀濒危物种的 SSR 位点、SNP 位点、表达序列标签 (EST-SSR) 等信息相对匮乏, 利用 RNA-Seq 技术能获得大量序列信息用来进行位点筛选, 且 RNA-seq 技术检测出的位点两翼区域较为保守, 有助于为珍稀濒危植物的遗传结构分析、推测物种迁移路线、相近种属间的分类及后续分子标记育种等方面奠定基础<sup>[36]</sup>。目前, 已在部分珍稀濒危物种的研究中得到实际应用, 详见附表<sup>[37-50]</sup>。例如, Xu 等<sup>[37]</sup>利用 Ion Torrent PGM 平台对铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*) 进行转录组测序, 使用 MISA 在 7 332 条 Unigenes 中检测出 8 527 个 SSR 位点, 有 17 对引物在 68 对随机特异性引物中表现多态性, 且 17 个位点均成功完成跨物种转移测试, 表现出这些位点具有高度多态性与可迁移性, 是下一步研究铁皮石斛系统发育的重要工具。Liu 等<sup>[38]</sup>分离了濒危物种白桂木 (*Artocarpus hypargyreus*) 中 10 个新的多态性 SSR 位点, 这些位点将有助于研究白桂木的种群结构及波罗蜜属等相近种属间的遗传结构。Li 等<sup>[39]</sup>应用 Illumina HiSeq 2000 平台和 SSR Locator 软件, 在台湾穗花杉 (*Amentotaxus formosana*) 中检测出 4 955 个潜在 EST-SSR 位点, 并进一步借助筛选出的 23 个在穗花杉属物种间具有多态性和转移性的 EST-

SSR 位点进行遗传结构分析, 证实了华西穗花杉 (*Amentotaxus argotaenia*) 和台湾穗花杉为独立物种, 云南穗花杉 (*Amentotaxus yunnanensis*) 与山地穗花杉 (*Amentotaxus poilanei*) 是同种物种。Hu<sup>[40]</sup>利用已公开的濒危植物甘草 (*Glycyrrhiza uralensis*) 转录组数据库, 检测出 30 030 个潜在 SNPs, 根据多态率, 能进一步得到约 15 500 个 SNP 位点, 可在后续甘草野生型研究中用于高通量基因分型分析系统, 有助于评估甘草的保护遗传资源及分子标记辅助育种。这些研究证明了 RNA-Seq 作为一种高效的分子研究技术, 非常适宜于珍稀濒危植物的分子标记开发。

### 3 RNA-Seq 技术在珍稀濒危植物研究中的应用前景

#### 3.1 珍稀濒危植物种质资源保育与利用

随着全球气候的变化及人为因素的影响, 许多濒危植物的生长环境受到严重破坏, 如土地过度开采导致植物原本分布区缩小, 由于人类过度放牧, 作为牧草的濒危植物遭受牲畜啃食, 导致种类与数量愈发紧张。其中部分濒危植物的药用、观赏、育种、环境治理等价值显著, 可进行人工扩大生产, 实现通过利用促进保护和发展。目前人工野生栽培濒危植物已有成果, 但其中存在不少的种质资源杂乱、退化等现象, 这就要求对其生长机制、遗传体制、活性成分等进行准确的研究和归纳。因此, 我们能够运用 RNA-Seq 技术, 在获得物种的转录组信息的基础上, 分析对比不同地区种源的遗传多样性, 可以实现针对性的对种质资源进行保护和修复。另外在转录组水平上探究种源间的特性差异, 预测并筛选出在特定生长环境中能表现出长势健康、适应性强、抗逆能力显著、活性成分含量高、优异的种质资源, 进行扩大栽培, 能够为更好地实现珍稀濒危植物可持续利用及后续研究奠定基础。通过获得国内外濒危植物转录组信息, 对各珍稀植物种质资源进行收集、归纳、评估, 分析种质资源间遗传结构的联系与异同, 这能更进一步拓展我国植物种质资源的遗传多样性, 对于提高林木、花卉、牧草、农作物和中草药等的育种效率以及改善人类生活的生态环境具有重要意义。

#### 3.2 结合第三代测序技术

目前珍稀濒危植物转录组研究绝大部分是基于二代测序技术展开进行, 随着生物、医学等领域

研究的不断突破和持续深入,人们逐渐发现在二代测序技术的实验过程中,存在PCR扩增的模板迁移、碱基错配、GC偏好性等现象,会导致测序结果出现偏差,使得二代测序技术存在了难以避免的缺陷<sup>[51]</sup>。另外,很多珍稀濒危植物的基因组庞大而复杂,常常包含高度重复序列区域,且珍稀濒危植物具有众多古老而未知的孑遗物种遗传背景,在没有参考基因组的情况下,利用二代测序技术来针对珍稀濒危植物物种生成高质量的组装序列通常是巨大的挑战。

近几年新兴起的 Iso-Seq 测序,是使用第三代测序来获得转录本全长序列的转录组测序技术。由于三代测序是单分子超长测序,读数更长更完整的同时也有效规避了二代测序中PCR扩增、序列组装过程带来的不确定性,但因其通量远低于二代测序,因此研究人员常利用二代测序来辅助修正三代测序,即二、三代联合测序成为当前最理想的选择。目前,基于RNA-Seq与Iso-Seq联合测序的方法参与植物转录组的研究已有一定数量,虽然其中与珍稀濒危植物相关的研究较少,但研究成果较为显著。例如:Zhang等<sup>[14]</sup>同时利用二代Illumina和三代PacBio Sequel平台,对干旱胁迫处理前后的濒危植物海南华石斛(*Dendrobium sinense*)植株进行转录组联合测序,分析后确定嘌呤代谢与苯丙烷类生物合成途径在华石斛响应于干旱胁迫过程中起到关键作用;Wang等<sup>[24]</sup>同样对濒危植物铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)的叶片与原球茎样体进行转录组测序对比分析,确定了其多糖、生物碱和类黄酮等活性化合物的生物合成途径中的关键基因,同时首次在铁皮石斛叶片中发现了编码生物碱合成酶异胡豆苷- $\beta$ -D-葡糖苷酶、缝籽木榛合成酶、Vinorine合成酶的基因。这些研究成果充分验证了Iso-Seq技术在珍稀濒危植物转录组测序研究中的可行性。

当前第三代测序技术正不断发展完善,以美国PacBio RS、PacBio Sequel和英国ONT GridION X5、MinION、PromethION为代表的三代测序平台已颇为成熟。Iso-Seq技术的研究内容已有转录本结构分析、差异基因筛选、基因调控机制、新基因预测、可变剪接位点检测等方面,在模式植物高粱(*Sorghum bicolor*)<sup>[52]</sup>、野草莓(*Fragaria vesca*)<sup>[53]</sup>、非模式植物甘蔗(*Saccharum officinarum*)<sup>[54]</sup>、黄芪(*Astragalus membranaceus*)<sup>[55]</sup>等物种中得到了实际

应用。相信未来在三代测序技术的加持下,拥有独特优势的Iso-Seq技术将为珍稀濒危植物的全长转录组库建立、基因注释完善、优异基因挖掘等研究工作开辟更多新的领域。

### 3.3 开展多组学整合分析

在测序技术不断进步及生物信息学分析手段持续革新的形势下,组学技术已经帮助人类解决众多生命现象的难题。在组学发展早期,众多研究是围绕单项组学进行,但由于生命体自身的复杂性,导致人们逐渐发现在单一层次探索生命活动的变化难以得到可靠的研究成果<sup>[56]</sup>。因此,除了对珍稀濒危植物开展转录组等单项组学研究外,还可以在此基础上与其他组学进行整合并联合分析,各项组学技术拥有的不同特点能够弥补单组学的局限性,进一步在系统层面实现更加透彻与具体的探索珍稀濒危植物生命活动现象的可能性。蛋白组测序技术和代谢组测序技术在珍稀濒危植物的相关研究中同样发挥了重要作用。已有研究表明,植物的大部分生物学过程(如金属胁迫响应、种子萌发等)的变化通常主要为蛋白质表达水平变化的结果,这种变化难以在基因组或转录组水平被完全捕捉,因此利用蛋白组测序技术阐明特定状态下珍稀濒危植物体中蛋白质的种类与作用关系是必要的研究手段<sup>[57]</sup>。目前已有*Cariniana legalis*<sup>[58]</sup>、胡黄连(*Picrorhiza kurrooa*)<sup>[59]</sup>、牛皮杜鹃(*Rhododendron chrysanthum*)<sup>[60]</sup>等物种的蛋白质组被测序,这些测序结果对于分析该物种的抗逆、种子萌发、胚胎发育等机制具有重要作用。不少珍稀濒危植物中含有高价值的药用代谢产物,具有极大的开发利用研究价值,而代谢组能帮助其产物鉴定、品种选育、代谢网络等方面的深入研究<sup>[61]</sup>,如已有研究者对云南红豆杉(*Taxus yunnanensis*)<sup>[62]</sup>、锁阳(*Cynomorium songaricum*)<sup>[63]</sup>、印度没药树(*Commiphora wightii*)<sup>[64]</sup>等濒危物种进行了代谢组研究并取得显著成果,意味着代谢组学是开展珍稀濒危植物研究的必然选择。除了转录组、蛋白质组和代谢组3种已经被应用在珍稀濒危植物研究中的组学技术以外,其他一些组学研究手段同样具有很好的应用前景。例如,表观遗传组学以探究DNA序列在没有改变的情况下基因表达量、表达位置发生变化且发生后代遗传现象的原因为目标,在将来探索珍稀濒危植物表型可塑性与环境适应性关系,以及对剖析植物体生长形

态发生过程,实现珍稀濒危植物的人工扩繁具有重要意义<sup>[65]</sup>。单细胞组学作为当下新起之秀,利用单细胞转录组技术得到单个细胞的全部转录本信息,不仅能够更加准确地解释单个细胞中的基因表达情况,同时能揭示其他组学无法处理的细胞异质性现象,为珍稀濒危植物鉴定细胞类型、推断细胞分化轨迹以及单细胞水平上对环境响应机制的研究提供更全面的数据支持<sup>[66-67]</sup>。

当前关于珍稀濒危植物多组学整合分析研究报道的数量屈指可数,未来人们在符合自身研究需求的前提下,可以对珍稀濒危植物开展转录组及其他组学技术间的整合,在不同研究方向提出新的转录组学研究思路,同时也多加弥补珍稀濒危植物在各项组学研究领域中的数据欠缺与空白(图4)。Li等<sup>[68]</sup>整合了转录组与蛋白质组来了解濒危植物疏花水柏枝(*Myricaria laxiflora*)的水淹

适应机制,得到了疏花水柏枝在淹水至淹后恢复过程9个时间点中的基因与蛋白质显著动态与阶段性表达的数据,最终分析出水淹下的疏花水柏枝分别在不同阶段发挥抗逆效果的基因和通路。Kan等<sup>[69]</sup>对广西地区珍贵树种紫荆木(*Madhuca pasquieri*)展开了转录组与代谢组学整合分析,对比刚萌发后幼苗5个阶段的数据变化,通过加权基因共表达网络分析以及对转录组、代谢组数据的联合分析,推测出紫荆木在幼苗时期体内累积的黄酮类化合物抑制 *PIN4* 基因的表达,阻碍了幼苗时期紫荆木体内生长激素正常的极性运输,揭示了其幼苗生长缓慢,种群更新能力极弱的原因之一。这些研究成果(详见电子附件)为各自物种进行科学有效的保护提供了理论帮助,同时也为日后开展更多珍稀濒危植物多组学整合分析的研究提供了借鉴。

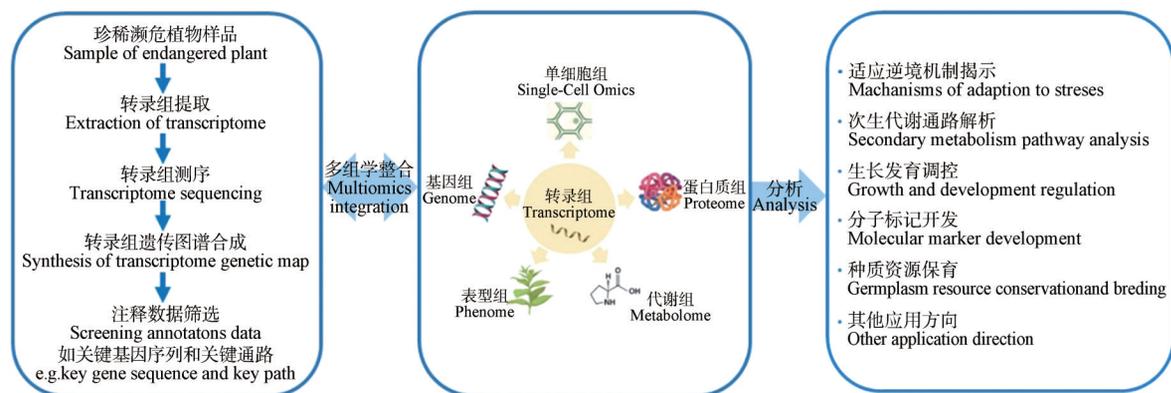


图4 珍稀濒危植物转录组学研究思路

珍稀濒危植物转录组研究步骤主要包括珍稀濒危植物样品的制备、转录组数据的提取、转录组测序、转录组遗传图谱合成、数据筛选等。另外,转录组学还可与基因组、代谢组、表型组、蛋白质组及单细胞组学等进行多组学整合,在珍稀濒危植物的逆境适应机制、次生代谢通路、生长发育调节、分子标记开发、种质资源保育等研究方向进行分析

Fig.4 Research ideas on transcriptome of rare and endangered plants

Transcriptome research steps of rare and endangered plants mainly included sample preparation, extraction of transcriptome data, transcriptome sequencing, synthesis of transcriptome genetic map, data screening, etc. In addition, transcriptomics could be the integrated with genome, phenome, proteome, metabolome and single-cell omics to analyze the stress adaptation mechanisms, secondary metabolic pathways, growth and development regulation, development of molecular markers, conservation of germplasm resources of rare and endangered plants

## 4 结语

近年来濒危物种的数量与日俱增,对其进行科学合理的保护已迫在眉睫,而目前在众多珍稀濒危植物资源中,已研究和挖掘的物种仍然是屈指可数,还有很多珍稀濒危植物的宝贵遗传资源亟待开发。总而言之,大量研究报道表明 RNA-Seq 技术是深入剖析珍稀濒危植物资源的基因信息并揭示其遗传本质的高效工具。另外,随着研

究深度的需要,与多组学技术的整合能够更全面的为珍稀濒危植物的逆境响应、次生代谢途径等生化遗传育种方向的研究提供更全面的数据资料及新的研究思路,从而对珍稀濒危植物合理高效的保育和利用发挥重要作用,并为日后保护生态环境以及资源的可持续发展贡献有力的理论基础保障。

本文关于珍稀濒危植物部分物种的转录组研

究成果见附录(<http://bbr.nefu.edu.cn/CN/10.7525/j.issn.1673-5102.2023.04.001>)

## 参 考 文 献

- [1] 覃海宁,赵莉娜.中国高等植物濒危状况评估[J].生物多样性,2017,25(7):689-695.  
QIN H N, ZHAO L N. Evaluating the threat status of higher plants in China[J]. Biodiversity Science, 2017, 25(7): 689-695.
- [2] 谭聃,欧铜.第三代测序技术的研究进展与临床应用[J].生物工程学报,2022,38(9):3121-3130.  
TAN D, OU T. Research progress and clinical application of the third-generation sequencing techniques[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(9): 3121-3130.
- [3] 刘玉洁,胡海洋.第三代测序技术及其在生物学领域的革新[J].科技与创新,2021(5):34-39.  
LIU Y J, HU H Y. Third-generation sequencing techniques and its innovation in the field of biology[J]. Science and Technology & Innovation, 2021(5): 34-39.
- [4] 刘伟,郭光艳,秘彩莉.转录组学主要研究技术及其应用概述[J].生物学教学,2019,44(10):2-5.  
LIU W, GUO G Y, BEI C L. A summary of the main research techniques of transcriptology and their applications[J]. Biology Teaching, 2019, 44(10): 2-5.
- [5] LOCKHART D J, WINZELER E A. Genomics, gene expression and DNA arrays[J]. Nature, 2000, 405(6788): 827-836.
- [6] VELCULESCU V E, ZHANG L, ZHOU W, et al. Characterization of the yeast transcriptome [J]. Cell, 1997, 88(2):243-251.
- [7] 周华,张新,刘腾云,等.高通量转录组测序的数据分析与基因发掘[J].江西科学,2012,30(5):607-611.  
ZHOU H, ZHANG X, LIU T Y, et al. Data processing and gene discovery of high-throughput transcriptome sequencing[J]. Jiangxi Science, 2012, 30(5): 607-611.
- [8] 张春兰,秦孜娟,王桂芝,等.转录组与RNA-Seq技术[J].生物技术通报,2012(12):51-56.  
ZHANG C L, QIN Z J, WANG G Z, et al. Transcriptome and RNA-Seq technology[J]. Biotechnology Bulletin, 2012(12): 51-56.
- [9] WANG Z, GERSTEIN M, SNYDER M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics[J]. Nature Reviews Genetics, 2009, 10(1):57-63.
- [10] 杜超.WRKY 转录因子家族在植物响应逆境胁迫中的功能及应用[J].草业科学,2021,38(7):1287-1300.  
DU C. Function and application of the WRKY transcription factor superfamily in plant response to stresses[J]. Pratacultural Science, 2021, 38(7): 1287-1300.
- [11] LI L, LI M M, QI X W, et al. De novo transcriptome sequencing and analysis of genes related to salt stress response in *Glehnia littoralis*[J]. PeerJ, 2018, 6: e5681.
- [12] MALA D, AWASTHI S, SHARMA N K, et al. Comparative transcriptome analysis of *Rheum australe*, an endangered medicinal herb, growing in its natural habitat and those grown in controlled growth chambers[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1):3702.
- [13] SUN Y B, LIU L H, SUN S K, et al. An *DHN*, a dehydrin protein from *Ammopiptanthus nanus*, mitigates the negative effects of drought stress in plants [J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 788938.
- [14] ZHANG C L, CHEN J H, HUANG W X, et al. Transcriptomics and metabolomics reveal purine and phenylpropanoid metabolism response to drought stress in *Dendrobium sinense*, an endemic orchid species in Hainan island[J]. Frontiers in Genetics, 2021, 12: 692702.
- [15] PURAYIL F Y, RAJASHEKAR B, KURUP S S, et al. Transcriptome profiling of *Haloxylon persicum* (Bunge ex Boiss and Buhse) an endangered plant species under PEG-induced drought stress [J]. Genes, 2020, 11(6):640.
- [16] ZHAO D K, SHI Y N, SENTHILKUMAR H A, et al. Enriched networks 'nucleoside/nucleotide and ribonucleoside/ribonucleotide metabolic processes' and 'response to stimulus' potentially conferred to drought adaptation of the epiphytic orchid *Dendrobium wangliangii* [J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2019, 25(1):31-45.
- [17] DHIMAN N, SHARMA N K, THAPA P, et al. De novo transcriptome provides insights into the growth behaviour and resveratrol and trans-stilbenes biosynthesis in *Dactylorhiza hatagirea*: an endangered alpine terrestrial orchid of western Himalaya[J]. Scientific Reports, 2019, 9:13133.
- [18] ZHANG J H, ZHU Y J, PAN Y, et al. Transcriptomic profiling and identification of candidate genes in two *Phoebe bournei* ecotypes with contrasting cold stress responses[J]. Trees, 2018, 32(5):1315-1333.
- [19] MENG D L, YU X H, MA L Y, et al. Transcriptomic response of Chinese yew (*Taxus chinensis*) to cold stress [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8:468.
- [20] POURSALAVATI A, RASHIDI-MONFARED S, EBRAHIMI A. Toward understanding of the methoxylated flavo-

- noid biosynthesis pathway in *Dracocephalum kotschy* Boiss[J].Scientific Reports, 2021, 11(1):19549.
- [21] VASHISHT I, PAL T, SOOD H, *et al.* Comparative transcriptome analysis in different tissues of a medicinal herb, *Picrorhiza kurroa* pinpoints transcription factors regulating picrosides biosynthesis [J]. Molecular Biology Reports, 2016, 43(12):1395-1409.
- [22] DANG Z H, ZHENG L L, WANG J, *et al.* Transcriptomic profiling of the salt-stress response in the wild recretohalophyte *Reaumuria trigyna* [J]. BMC Genomics, 2013, 14:29.
- [23] BISWAL B, JENA B, GIRI A K, *et al.* De novo transcriptome and tissue specific expression analysis of genes associated with biosynthesis of secondary metabolites in *Operculina turpethum* (L.) [J]. Scientific Reports, 2021, 11(1):22539.
- [24] WANG Z J, JIANG W M, LIU Y Y, *et al.* Putative genes in alkaloid biosynthesis identified in *Dendrobium officinale* by correlating the contents of major bioactive metabolites with genes expression between protocorm-like bodies and leaves [J]. BMC Genomics, 2021, 22(1):579.
- [25] SIAH C H, NAMASIVAYAM P, MOHAMED R. Transcriptome reveals senescing callus tissue of *Aquilaria malaccensis*, an endangered tropical tree, triggers similar response as wounding with respect to terpenoid biosynthesis [J]. Tree Genetics & Genomes, 2016, 12(2):33.
- [26] QIAO F, CONG H Q, JIANG X F, *et al.* De novo characterization of a *Cephalotaxus hainanensis* transcriptome and genes related to paclitaxel biosynthesis [J]. PLoS One, 2014, 9(9):e106900.
- [27] XIANG L, LI Y, ZHU Y J, *et al.* Transcriptome analysis of the *Ophiocordyceps sinensis* fruiting body reveals putative genes involved in fruiting body development and cordycepin biosynthesis [J]. Genomics, 2014, 103(1):154-159.
- [28] KALRA S, PUNIYA B L, KULSHRESHTHA D, *et al.* De novo transcriptome sequencing reveals important molecular networks and metabolic pathways of the plant, *Chlorophytum borivillianum* [J]. PLoS One, 2013, 8(12):e83336.
- [29] LIU S S, CHEN J, LI S C, *et al.* Comparative transcriptome analysis of genes involved in GA-GID1-DELLA regulatory module in symbiotic and asymbiotic seed germination of *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. (Orchidaceae) [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(12):30190-30203.
- [30] LI M, DONG X J, PENG J Q, *et al.* De novo transcriptome sequencing and gene expression analysis reveal potential mechanisms of seed abortion in dove tree (*Davidia involu-crata* Baill.) [J]. BMC Plant Biology, 2016, 16:82.
- [31] LIU X T, LIU T F, ZHANG C, *et al.* Transcriptome profile analysis reveals the regulation mechanism of stamen abortion in *Handeliidendron bodinieri* [J]. Forests, 2021, 12(8):1071.
- [32] TAO L, ZHAO Y, WU Y, *et al.* Transcriptome profiling and digital gene expression by deep sequencing in early somatic embryogenesis of endangered medicinal *Eleutherococcus senticosus* Maxim [J]. Gene, 2016, 578(1):17-24.
- [33] ZHANG S S, LI Y H, LI Y R, *et al.* Insights on seed abortion (endosperm and embryo development failure) from the transcriptome analysis of the wild type plant species *Paeonia lutea* [J]. Bioinformatics, 2020, 16(8):638-651.
- [34] LI X L, FAN J Z, LUO S M, *et al.* Comparative transcriptome analysis identified important genes and regulatory pathways for flower color variation in *Paphiopedilum hirsutissimum* [J]. BMC Plant Biology, 2021, 21(1):495.
- [35] 蒋景龙, 孙旺, 李丽, 等. 濒危植物秦岭石蝴蝶花瓣数量变异机理研究 [J]. 西北植物学报, 2021, 41(10):1652-1661.
- JIANG J L, SUN W, LI L, *et al.* Study on the variation mechanism of petals number of endangered plant *Petrocosmea qinlingensis* [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2021, 41(10):1652-1661.
- [36] 李美琼, 高浦新, 朱友林, 等. 微卫星 (SSR) 分子标记应用于濒危植物保护的研究进展 [J]. 南方林业科学, 2011(2):24-28.
- LI M Q, GAO P X, ZHU Y L, *et al.* Research advances in microsatellite (SSR) marker applied in conservation of endangered plants [J]. South China Forestry Science, 2011(2):24-28.
- [37] XU M, LIU X, WANG J W, *et al.* Transcriptome sequencing and development of novel genic SSR markers for *Dendrobium officinale* [J]. Molecular Breeding, 2017, 37(2):18.
- [38] LIU H J, TAN W Z, SUN H B, *et al.* Development and characterization of EST-SSR markers for *Artocarpus hypargyreus* (Moraceae) [J]. Applications in Plant Sciences, 2016, 4(12):1600113.
- [39] LI C Y, CHIANG T Y, CHIANG Y C, *et al.* Cross-species, amplifiable EST-SSR markers for *Amentotaxus* species obtained by next-generation sequencing [J]. Molecules, 2016, 21(1):67.
- [40] HU W M. Development of 31 EST-SNP markers in *Glyc-*

- yrhiza uralensis* Fisch (Leguminosae) based on transcriptomics[J]. Conservation Genetics Resources, 2020, 12(2):219-223.
- [41] VU D D, SHAH S N M, PHAM M P, *et al.* De novo assembly and transcriptome characterization of an endemic species of Vietnam, *Panax vietnamensis* Ha et Grushv., including the development of EST-SSR markers for population genetics[J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1):358.
- [42] XU M, LI Z T, WANG J W, *et al.* RNA sequencing and SSR marker development for genetic diversity research in *Woonyoungia septentrionalis* (Magnoliaceae)[J]. Conservation Genetics Resources, 2018, 10(4):867-872.
- [43] XU D L, CHEN H B, ACI M, *et al.* De novo assembly, characterization and development of EST-SSRs from *Bletilla striata* transcriptomes profiled throughout the whole growing period [J]. PLoS One, 2018, 13(10): e0205954.
- [44] ZHOU T, LI Z H, BAI G Q, *et al.* Transcriptome sequencing and development of genic SSR markers of an endangered Chinese endemic genus *Dipteronia oliver* (Aceraceae)[J]. Molecules, 2016, 21(3):166.
- [45] JIN Y Q, BI Q X, GUAN W B, *et al.* Development of 23 novel polymorphic EST-SSR markers for the endangered relict conifer *Metasequoia glyptostroboides* [J]. Applications in Plant Sciences, 2015, 3(9):1500038.
- [46] XIANG X Y, ZHANG Z X, WANG Z G, *et al.* Transcriptome sequencing and development of EST-SSR markers in *Pinus dabeshanensis*, an endangered conifer endemic to China[J]. Molecular Breeding, 2015, 35(8):158.
- [47] 杨洁. 特有濒危植物青檀微卫星(EST-SSR)分子标记开发及其小尺度空间遗传结构研究[D]. 南京:南京大学, 2016.
- YANG J. Development of polymorphic microsatellite loci and study on fine-scale spatial genetic structure of *Pteroceltis tatarinowii*, an endangered plant endemic to China [D]. Nanjing: Nanjing University, 2016.
- [48] 黄蕾. 珍稀濒危植物四合木 Genic-SSR 标记的开发及种群遗传学研究[D]. 呼和浩特:内蒙古大学, 2021.
- HUANG L. Genic-SSR markers development and population genetic study of the rare and endangered plant *Tetraena mongolica* [D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2021.
- [49] ZHOU X J, WANG Y Y, XU Y N, *et al.* De novo characterization of flower bud transcriptomes and the development of EST-SSR markers for the endangered tree *Tapi- scia sinensis* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(6):12855-12870.
- [50] HUANG D N, ZHANG Y Q, JIN M D, *et al.* Characterization and high cross-species transferability of microsatellite markers from the floral transcriptome of *Aspidistra saxicola* (Asparagaceae) [J]. Molecular Ecology Resources, 2014, 14(3):569-577.
- [51] GUO J D, HUANG Z, SUN J L, *et al.* Research progress and future development trends in medicinal plant transcriptomics [J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12:691838.
- [52] WANG B, REGULSKI M, TSENG E, *et al.* A comparative transcriptional landscape of maize and sorghum obtained by single-molecule sequencing [J]. Genome Research, 2018, 28(6):921-932.
- [53] LI Y P, DAI C, HU C G, *et al.* Global identification of alternative splicing via comparative analysis of SMRT- and Illumina-based RNA-seq in strawberry [J]. The Plant Journal, 2017, 90(1):164-176.
- [54] HOANG N V, FURTADO A, MASON P J, *et al.* A survey of the complex transcriptome from the highly polyploid sugarcane genome using full-length isoform sequencing and de novo assembly from short read sequencing [J]. BMC Genomics, 2017, 18(1):395.
- [55] LI J, HARATA-LEE Y, DENTON M D, *et al.* Long read reference genome-free reconstruction of a full-length transcriptome from *Astragalus membranaceus* reveals transcript variants involved in bioactive compound biosynthesis[J]. Cell Discovery, 2017, 3:17031.
- [56] 钟雅婷, 林艳梅, 陈定甲, 等. 多组学数据整合分析和应用研究综述[J]. 计算机工程与应用, 2021, 57(23):1-17.
- ZHONG Y T, LIN Y M, CHEN D J, *et al.* Review on integration analysis and application of multi-omics data [J]. Computer Engineering and Applications, 2021, 57(23):1-17.
- [57] LIU Y H, LU S, LIU K F, *et al.* Proteomics: a powerful tool to study plant responses to biotic stress [J]. Plant Methods, 2019, 15:135.
- [58] TRINDADE B M C, REIS R S, VALE E M, *et al.* Proteomics analysis of the germinating seeds of *Cariniana legalis* (Mart.) Kuntze (Meliaceae): an endangered species of the Brazilian Atlantic rainforest [J]. Brazilian Journal of Botany, 2018, 41(1):117-128.
- [59] PARKASH J, KASHYAP S, KALITA P J, *et al.* Differential proteomics of *Picrorhiza kurroa* Royle ex Benth. in response to dark stress [J]. Molecular Biology Reports,

- 2014,41(9):6051-6062.
- [60] ZHOU X F, CHEN S L, WU H, *et al.* Biochemical and proteomics analyses of antioxidant enzymes reveal the potential stress tolerance in *Rhododendron chrysanthum* Pall[J]. *Biology Direct*, 2017, 12(1):10.
- [61] XIAO Q, MU X L, LIU J S, *et al.* Plant metabolomics: a new strategy and tool for quality evaluation of Chinese medicinal materials [J]. *Chinese Medicine*, 2022, 17(1):45.
- [62] YU C N, LUO X J, ZHAN X R, *et al.* Comparative metabolomics reveals the metabolic variations between two endangered *Taxus* species (*T. fuana* and *T. yunnanensis*) in the Himalayas[J]. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1):197.
- [63] ZHENG Y, SUN X, MIAO Y J, *et al.* A systematic study on the chemical diversity and efficacy of the inflorescence and succulent stem of *Cynomorium songaricum* [J]. *Food & Function*, 2021, 12(16):7501-7513.
- [64] VERMA R K, IBRAHIM M, FURSULE A, *et al.* Effect of aging and geographical variations in the content of guggulsterones and metabolomic profiling of oleogum resins of *Commiphora wightii*: the indian bdellium[J]. *Pharmacognosy Magazine*, 2021, 17(76):774-779.
- [65] AMARAL J, RIBEYRE Z, VIGNEAUD J, *et al.* Advances and promises of epigenetics for forest trees [J]. *Forests*, 2020, 11(9):976.
- [66] RYU K H, HUANG L, KANG H M, *et al.* Single-cell RNA sequencing resolves molecular relationships among individual plant cells [J]. *Plant Physiology*, 2019, 179(4):1444-1456.
- [67] SHULSE C N, COLE B J, CIOBANU D, *et al.* High-throughput single-cell transcriptome profiling of plant cell types[J]. *Cell Reports*, 2019, 27(7):2241-2247.e4.
- [68] LI L B, HUANG G Y, XIANG W B, *et al.* Integrated transcriptomic and proteomic analyses uncover the regulatory mechanisms of *Myricaria laxiflora* under flooding stress[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13:924490.
- [69] KAN L, LIAO Q C, CHEN Z P, *et al.* Dynamic transcriptomic and metabolomic analyses of *Madhuca pasquieri* (Dubard) H. J. Lam during the post-germination stages [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12:731203.