

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201907060

周延清, 邵露莹, 郭萌萌, 等. 地黄 *C3H* 基因的克隆及生物信息学分析 [J]. 广西植物, 2020, 40(9): 1281–1287.

ZHOU YQ, SHAO LY, GUO MM, et al. Cloning and bioinformatics analysis of *C3H* gene in *Rehmannia glutinosa* [J]. *Guihaia*, 2020, 40(9): 1281–1287.

地黄 *C3H* 基因的克隆及生物信息学分析

周延清*, 邵露莹, 郭萌萌, 朱佳琳

(河南师范大学 生命科学院, 河南 新乡 453000)

摘要: 香豆酸-3-羟化酶属于植物中最大的蛋白酶细胞色素 P450 家族之一, 在植物生命活动中发挥着重要作用。为了解地黄香豆酸-3-羟化酶基因 *RgC3H* 合成毛蕊花糖苷的功能, 该研究基于地黄代谢组学分析获得 KEGG 途径中的 *C3H*, 采用多重比对在 NCBI 中获得同源基因的一个保守序列, 并基于该保守序列和地黄 SRA 数据库, 采用电子克隆和 RT-PCR 克隆技术获得地黄 *C3H* 基因全长 CDS (*RgC3H*), 对其进行生物信息学分析。结果表明: *RgC3H* 基因全长为 1 530 bp, 且编码一个含 509 个氨基酸、分子量为 57.91 kD、无信号肽的蛋白质; 基于氨基酸序列的结构分析显示, *RgC3H* 有一个保守区域-P450 结构域; 系统进化分析结果显示, *RgC3H* 与芝麻和猴面花的 *C3H* 基因具有很高的同源性。上述结果为进一步研究 *RgC3H* 基因在地黄毛蕊花糖苷生物合成途径中的作用奠定了基础。

关键词: 地黄, *C3H* 基因, 基因克隆, 生物信息学分析

中图分类号: Q943 文献标识码: A

文章编号: 1000-3142(2020)09-1281-07

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Cloning and bioinformatics analysis of *C3H* gene in *Rehmannia glutinosa*

ZHOU Yanqing*, SHAO Luying, GUO Mengmeng, ZHU Jialin

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453000, Henan, China)

Abstract: Coumarin-3-hydroxylase belongs to the cytochrome P450 family, one of the largest protease families, and plays an important role in plants. However, its role for verbascoside biosynthesis remains deficient. In order to understand the role of P-coumarate 3-hydroxylase for verbascoside biosynthesis in *Rehmannia glutinosa* (*RgC3H*), *C3H* was mined from a candidate KEGG pathway based on the metabolomics analysis of *R. glutinosa*, and a conserved sequence of homologous gene was obtained in NCBI by multiple alignment. According to its fragment and SRA database of *R. glutinosa*, we cloned its full length CDS (*RgC3H*) by electro cloning and RT-PCR, and performed its bioinformatics analyses. The results were as fol-

收稿日期: 2019-07-26

基金项目: 国家级项目培育基金(2016PL11); 河南省自然科学基金(182300410018); 校内结余项目(5201049170556) [Supported by the National Project Cultivation Fund Project(2016PL11); Natural Science Foundation of Henan Province(182300410018); Campus Balance Project(5201049170556)].

作者简介: 周延清(1963-), 男, 河南邓州人, 博士, 教授, 主要从事遗传学和生物学专业英语教学及植物分子遗传学研究, (E-mail) yqzhou@htu.cn.

* 通信作者

lows: *RgC3H* gene was 1 530 bp in length and encoded a 509-amino acid protein with a molecular weight of 57.91 kD and without signal peptide; According to its amino acid sequence and structural analysis, *RgC3H* contained one conserved domain-cytochrome P450 domain, suggesting that it belonged to cytochrome P450 family; Phylogenetic tree analysis showed that *RgC3H* had high homology with the *C3H* genes of *Sesamum indicum* and *Erythranthe guttata*. This study laid a foundation for further research on the role of *RgC3H* gene in the pathway of verbascoside biosynthesis in *Rehmannia glutinosa*.

Key words: *Rehmannia glutinosa*, *C3H* gene, gene cloning, bioinformatics

地黄是“四大怀药”之一,属于玄参科地黄属多年生草本植物,是一种重要的传统中药药材,种类繁多,具有益阴生津、清凉热血等功效。目前,有关地黄的基因不断被挖掘和分析,如地黄纤维素合酶基因(周延清等,2015)、*RgTPI* 基因(邵露莹等,2018)、*RghBNG* 基因(张喻,2014)等,但明确相应功能的基因并不多。

香豆酸-3-羟化酶(p-coumarate 3-hydroxylase, *C3H*)属于细胞色素 P450 中的 CYP98 亚家族,细胞色素 P450 参与木质素中间物的生物合成过程中,在植物生长发育过程中发挥重要作用(贺丽虹等,2008)。目前,*C3H* 基因已在拟南芥(Schoch et al., 2001)、慈竹(周美娟等,2012)、苧麻(袁有美等,2017)等植物中逐步被鉴定。*C3H* 是毛蕊花糖苷等多种物质生物合成途径中的一条共有途径-苯丙素途径中的一个限速酶,地黄转录组测序挖掘出其 *Unigenes*(Wang et al., 2017),地黄代谢组分析挖掘出 *C3H* 及其催化途径(Zhou et al., 2018)。其与毛蕊花糖苷合成相关的作用被初步证实(Wang et al., 2017)。但是,地黄全长 *C3H* 基因的克隆及生物信息学分析尚未见报道。本研究基于地黄代谢组分析挖掘的 *C3H*,采用同源克隆、电子克隆技术结合 RT-PCR 的方法首次获得了 *RgC3H* 全长 CDS,并对其碱基序列及其编码的蛋白质序列进行了生物信息学分析,为进一步研究其在地黄毛蕊花糖苷途径中的作用及其他功能的开发应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

地黄品种温 85-5 块根,种植于河南师范大学实验田。获得的 *RgC3H* 基因部分保守序

列:GAGTTCAGACCCGAGAGGTTTCAAGAGGAGGACATCGACATGAAGGGGACCGATTATCGGCTACTCCGTTCGGGTCAGGACGGCGTATTTGCCCCGGTGCACAACCTTGCTATCAACTTGGTG。*RgC3H* 基因引物序列为(F: 5'-ATGGCTATCCCTCTCCTCAT-3', R: 5'-GCAAAAGAAAAGAACCATA-3'),引物序列合成于英潍捷基(上海)贸易有限公司。琼脂糖、溴化乙锭(四川维克奇生物科技有限公司),DNA Marker(DL2 000)(宝生物生物技术公司)

1.2 方法

1.2.1 目的基因 *RgC3H* 全长 CDS 的获取 依据地黄代谢组学分析候选 KEGG 通路挖掘出 *RgC3H* 酶(Zhou et al., 2018),并在 NCBI 数据库中下载与地黄亲缘关系较近物种的已知 *C3H* 的核苷酸序列进行同源比对,获得 *C3H* 部分保守序列。找到地黄相关的 SRA 数据库在 Nucleotide Blast 中输入已知的部分序列,选择高度相似的序列检索地黄 SRA 数据库进行电子克隆。用 ORF Finder 软件预测 *RgC3H* 的完整 ORFs,利用软件 primer primer 5.0 设计用于 RT-PCR 的引物,并以温 85-5 块根的 cDNA 为模板,RT-PCR 反应体系参照王向楠(2017)。RT-PCR 程序为 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s,引物退火温度为 53 °C,退火时间为 30 s,72 °C 延伸时间 2 min,35 cycle; 72 °C 终延伸 10 min。RT-PCR 结束后,进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。产物胶回收后送至上海金唯智公司进行测序得到 *RgC3H* 基因的编码序列。

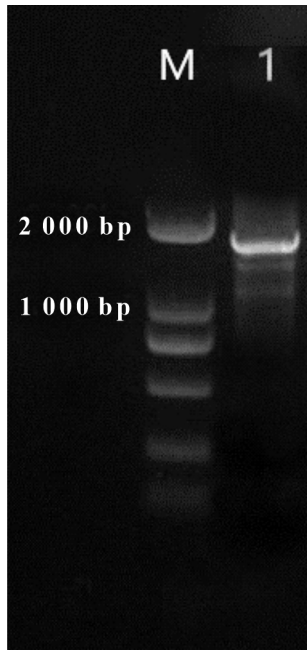
1.2.2 *RgC3H* 的生物信息学分析 将测序得到的 *RgC3H* 完整 CDS 区,用 NCBI 在线分析工具 ORF Finder 查找该基因开放阅读框 ORF;用 ProtParam 对 *RgC3H* 蛋白进行理化性质分析;用 TMHMM 2.0 和 NetPhos 3.1 Server 对 *RgC3H* 蛋白质的跨膜区和磷酸位点进行预测分析;应用 Signal P-5.0 对地黄

RgC3H 氨基酸序列进行信号肽的分析。用 SOPMA 及 SWISS-MODEL 分别对 RgC3H 蛋白的二级和三级结构进行分析。用 NCBI 的 CD search 和 InterProScan 对 RgC3H 蛋白的结构域进行分析。利用 NCBI 在线工具 Blast 查找与 *RgC3H* 同源性较高的序列,运用软件 DNAMAN6.0 进行同源性分析及采用 MEGA 6.0 软件构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 目的基因 *RgC3H* 全长 CDS 的获取

根据拼接得到的 CDS 序列设计引物,利用 RT-PCR 进行扩增,结果如图 1 所示。PCR 产物切胶回收送至上海金唯智公司进行测序所得基因序列结果如图 2 所示。CDS 全长为 1 530 bp,编码的蛋白共有 509 个氨基酸残基。



M. DL 2000 DNA 标记; 1. *RgC3H* 基因的 PCR 产物。
M. DL 2000 DNA marker; 1. PCR products of *RgC3H* gene.

图 1 RT-PCR 扩增 *RgC3H* 电泳

Fig. 1 Separation of RT-PCR amplified product of *RgC3H*

2.2 *RgC3H* 同源性分析及系统进化分析

通过 NCBI 的 Blastn 搜索与 *RgC3H* 基因核苷酸序列相似性较高的物种,用 DNAMAN6.0 多重比对结果表明 *RgC3H* 与芝麻 [*Sesamum indicum*

(NM_001304410.1)]、猴面花 [*Erythranthe guttata* (XM_012972625.1)]、桃儿七 [*Sinopodophyllum hexandrum* (KC110989.1)]、美花烟草 [*Nicotiana sylvestris* (XM_009766650.1)] 等物种的相似性分别依次为 91%、82%、72% 和 70% (图 3)。

为进一步研究 *RgC3H* 在其他植物之间的进化关系,利用 MEGA 6.0 进行 C3H 蛋白系统进化树的构建结果显示,芝麻、猴面花与地黄亲缘关系最近,率先聚为一支,后与美花烟草聚为一支,与相思木 (*Acacia koa*, KX784942.1)、锦鸡儿 (*Caragana sinica*, HQ829858.1)、木槿 (*Hibiscus syriacus*, JX003249.1) 的亲缘关系最远 (图 4)。

2.3 *RgC3H* 理化性质、功能及结构域预测

2.3.1 *RgC3H* 理化性质 应用 ProtParam 对 *RgC3H* 进行蛋白理化性质分析,发现其分子式为 $C_{2608}H_{4136}N_{706}O_{727}S_{28}$, 分子量为 57 911.50, 氨基酸总数为 509, 等电点 (pI) 为 8.89, 带负电荷的残基 (Asp+Glu) 总数为 60, 带正电荷的残基 (Arg+Lys) 总数为 67, 估计的半衰期为 30 h, 不稳定指数为 31.11, 蛋白质类型为稳定蛋白质。脂肪指数为 90.22, 亲水性的平均值 (GRAVY) 为 -0.202。

2.3.2 *RgC3H* 保守结构域预测 利用 NCBI 的 Conserved Domain Database 数据库分析结果表明 *RgC3H* 的保守结构域含有 P450 超家族,即属于细胞色素 P450 家族成员 (图 5)。

2.3.3 *RgC3H* 的跨膜区和磷酸化位点分析 用 TMHMM2.0 对 *RgC3H* 进行分析,结果表明 *RgC3H* 没有跨膜结构,且是膜外蛋白质。用 NetPhos 3.1 Server 对 *RgC3H* 进行磷酸化结构预测得出,苏氨酸磷酸化位点有 26 个;丝氨酸磷酸化位点有 20 个;酪氨酸磷酸化位点有 12 个。

2.3.4 *RgC3H* 信号肽分析 利用 Signal P-5.0 对地黄 *RgC3H* 氨基酸序列进行信号肽的可能性分析,结果表明,*RgC3H* 无信号肽,可推测该蛋白没有跨膜运输功能,不是分泌型蛋白。

2.4 *RgC3H* 二级结构、三级结构预测分析

本文应用 SOPMA 及 SWISS-MODEL 分别对 *RgC3H* 的二级和三级结构进行分析,发现其中 α 螺旋占最多,为 50.69%,其次是无规卷曲占 33.99%,延伸链占 9.43% 和 β 转角占 5.89% (图 6、图 7)。

```

1   ATGGCTATCCCTCTCCTCATTCTCTCCTTCTCACCATTTTCATCGCCTACAAACTCTTCCAGCGCCTCCGT
1   M A I P L L I L S F L T I F I A Y K L F Q R L R
73  TTCAAGCTTCCGCCGGCCACGCGCGCTCCCCATCGTCGGAACCTCTACGACCTAAAACCCGCTCCTCGTC
25  F K L P P G P R P L P I V G N L Y D L K P V L V
145 CGTTGTTTCCACGAGTGGTCTCAAATCTACGGCCGATCTTCTCCGTCTACTTGGGCTCGCATCTGAGCGTC
49  R C F T E W S Q I Y G P I F S V Y L G S H L S V
217 GTGGTGAAGTCTAGCTAGCTAGCTAAGGAGGTTTTGAAAGACAACGATCAGCAGTTGGCCAATAGGAACAGG
73  V V N S A E L A K E V L K D N D Q Q L A N R N R
289 ACGCGTCAGATTGCGAAGTTCAGCAAGAATGGGATGGATTGATTGGTCCGATTATGGCCCCACTATGTG
97  T R Q I A K F S K N G M D L I W S D Y G P H Y V
361 AAAGTGAAGAAATTGTGTACGCTTGGAGCTTTTCTCGATGAAGAGGATTGATCGCCTTAGGCCGATTAGAGAA
121 K V R K L C T L E L F S M K R I D A L R P I R E
433 GATGAAGTTACTGCCATGGTCGAGTCTATTTTCAAGGATTGTGTCAAGCCTGAAAACAAGGGCAAAGCTTTG
145 D E V T A M V E S I F K D C V K P E N K G K A L
505 GTGCTGCGCGAATACTTGGGAATGATGGCATTCCCTTACATAACAAGATTGAGTTTTGGGAAGAGATTTCATG
169 V L R E Y L G M M A F L H I T R L S F G K R F M
577 GACTCAAATGGTGAATTGATCAACAGGGAGAAGAGTTGAAGGGTATTCTAAACAACGGAATTAAGTTGGGT
193 D S N G V I D Q Q G E E L K G I L N N G I K L G
649 ACCAAGAAGTCCCTTCGCGGAGTTCCTCCCATGGTTGCGGTTCTTGTTCAGGCGGAGAACGAGGCGCTAGCA
217 T K K S F A E F L P W L R F L F K A E N E A L A
721 GAGCATGATGCACGTGCCGATAGCTTACCAAGAAAATCATGGAGGAACACACCATCGCACGGAAGAAAAC
241 E H D A R A D S F T K K I M E E H T I A R K K T
793 GGGAATACAAAAGCCATTTTCGTTCGATGCTTTGCTAACTCTTCAGAAGGAATATGACTTGAGTGAGGACACC
265 G N T K S H F V D A L L T L Q K E Y D L S E D T
865 ATTATCGGCCCTCTTTGGGACATGATCTCAGCCGCATGGACACCACCGATCACCCTCGAATGGGCTATG
289 I I G L L W D M I S A G M D T T T I T V E W A M
937 GCCGAGATGGTACGAAACCCGAGAGTGCAACAAAAGGTGCAAGAGGAACCTCGACCGTGTGCGTAAAGAT
313 A E M V R N P R V Q Q K V Q E E L D R V V G K D
1009 CGTGTAAATGACCGAAGCGGACATCCCAATCTCCCTTACTTGCAATGTGTGACCAAAGAATGTTTCAGAATG
337 R V M T E A D I P N L P Y L Q C V T K E C F R M
1081 CACCCTCCGACACCGCTGATGCTCCCCACAAGGCCAACACGAACGTCAAGATCGGCGGTTACGACGTC
361 H P P T P L M L P H K A N T N V K I G G Y D V P
1153 AAAGGAGCGACAGTGAAGCGTCAACGCGTGGGCCATCGCTCGGGACCCAGCTATCTGGA AAAACCTATCGAG
385 K G A T V S V N A W A I A R D P A I W K N P I E
1225 TTCAGACCCGAGAGGTTTCAAGAGGAGGACATCGACATGAAGGGGACCGATTATCGGCTACTTCCGTTCCGG
409 F R P E R F Q E E D I D M K G T D Y R L L P F G
1297 TCAGGACGGCGTATTTGCCCGGTGCACAACCTTGCTATCAACTTGGTGTTCATCCATGTTGGGACACATGGT
433 S G R R I C P G A Q L A I N L V S S M L G H M V
1369 CACCCTTTGATTGGGCCCTCCGGTGGGGTTAGGCCGGAAGATATGGACATGATGGAACAACCTGGAACG
457 H H F D W A P P A G V R P E D M D M M E Q P G T
1441 GTTACTTACATCGCAACCCCTCTCCAGGCTGTTCCGACGCCAAGGTTGTCGGCCGACCTGTTCAAGCGTGTG
481 V T Y M R T P L Q A V P T P R L S A D L F K R V
1513 GCTGTTGGAATGTATGA
505 A V G N V *

```

图 2 *RgC3H* 基因 CDS 的核苷酸及预测的氨基酸序列

Fig. 2 CDS sequence of *RgC3H* and amino acid sequence of its coding *RgC3H*

3 讨论与结论

地黄是一种大宗中草药,具有很高的观赏、食

用及药用价值,其主要生物活性成分毛蕊花糖苷对其药效意义重大。毛蕊花糖苷具有抗炎、抗菌、抗氧化、抗肿瘤、光保护、护肝、保护神经和免疫调节等多种生物活性(Li et al., 2019)。但是,地黄毛

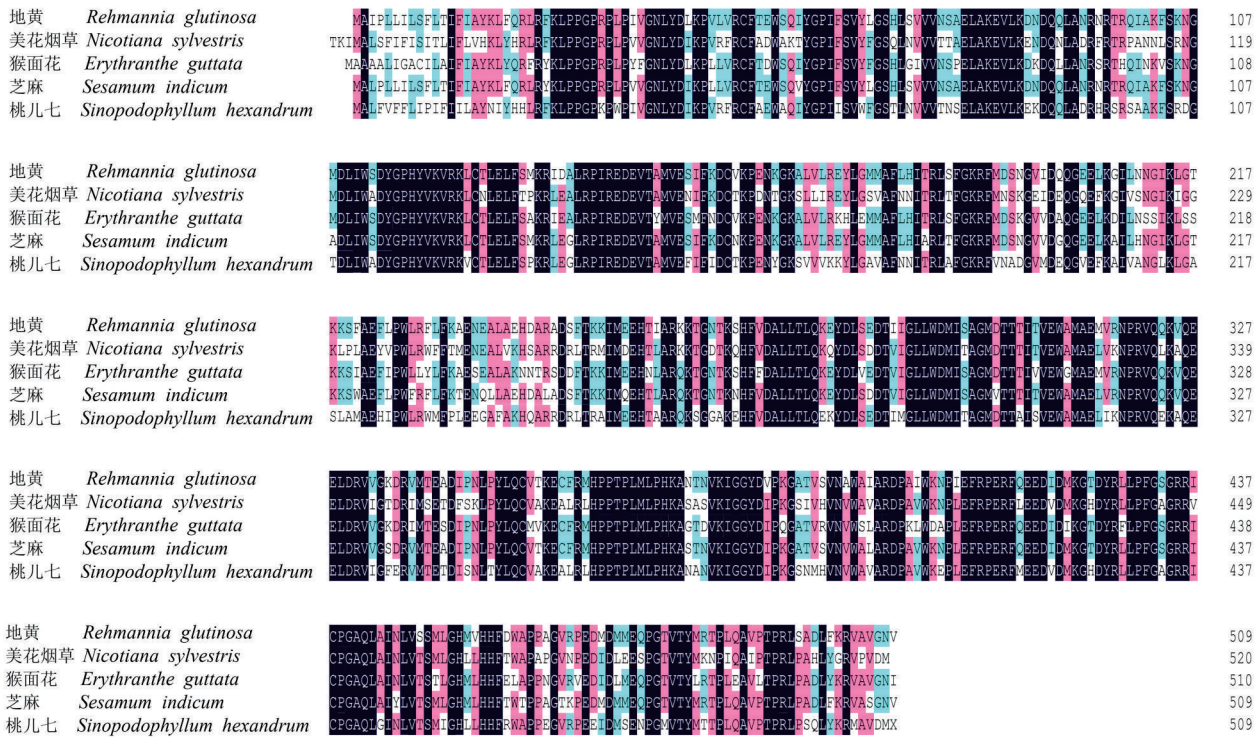


图 3 RgC3H 氨基酸序列的同源性比对

Fig. 3 Multiple alignment of amino acid sequence of RgC3H with other known plant species C3H

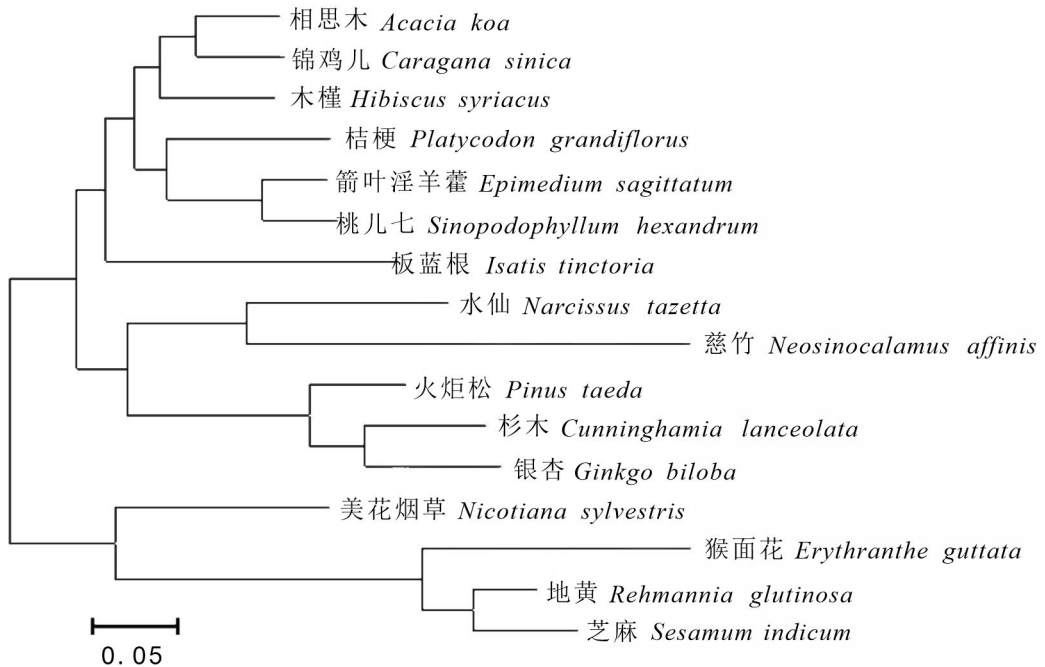


图 4 RgC3H 蛋白氨基酸序列的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of RgC3H protein amino acid sequences



图 5 RgC3H 保守结构域分析

Fig. 5 Conservative domain analysis of RgC3H

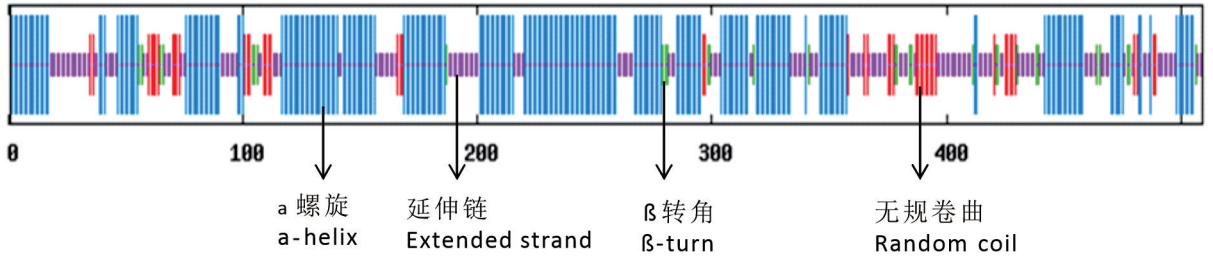
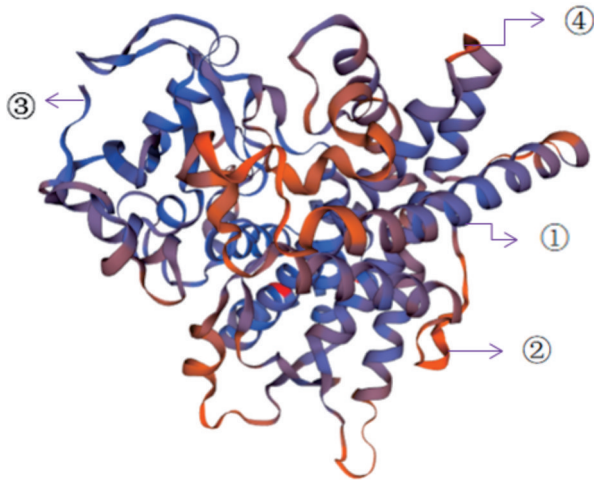


图 6 RgC3H 二级结构预测

Fig. 6 Prediction of secondary structure of RgC3H



①. α 螺旋; ②. 无规卷曲; ③. 延伸链; ④. β 转角。
①. Alpha helix; ②. Random coil; ③. Extended strand; ④. Beta turn.

图 7 RgC3H 三级结构预测

Fig. 7 Prediction of three-dimensional structure of RgC3H

蕊花糖苷含量很低,我国药典规定地黄毛蕊花糖苷含量不小于 0.02%。因此,需要解析地黄毛蕊花糖苷生物合成途径,探索提高地黄毛蕊花糖苷含量。毛蕊花糖苷生物合成途径有一条重要的苯丙烷合成途径,与木质素合成途径具有重叠步骤,而 C3H 正是两者重叠途径中的限速酶(Schoch et al., 2001),且前期研究已挖掘出了地黄 C3H

(Wang et al., 2017; Zhou et al., 2018) 及其编码基因 *RgC3H* 的 Unigene (Wang et al., 2017)。但是,没有克隆 *RgC3H* 全长基因和深入研究其合成毛蕊花糖苷的作用。

本研究基于地黄代谢组分析挖掘出 *C3H*, 采用同源克隆、电子克隆技术结合 RT-PCR 的方法首次获得了 *RgC3H* 全长 CDS, 并对其碱基序列及其编码的蛋白质的氨基酸序列进行了生物信息学分析, 这些结果体现了我们建立的基因克隆技术具有综合性、先进性和有效性; *RgC3H* 测序结果为 1 530 bp, 生物信息学分析表明其编码 509 个氨基酸, 具有 C3H 酶类的保守 P450 结构域, 这与前人从慈竹、苧麻、石榴等植物中克隆的 *C3H* 基因在基因大小、氨基酸残基个数等方面的结果一致(周美娟等, 2012; 袁有美等, 2017; 熊枫等, 2018); *RgC3H* 在氨基酸水平上与多种植物的 C3H 具有较高的同源性, 且系统进化树结果显示, 地黄 *RgC3H* 基因与芝麻 (NM_001304410.1) 和猴面花 (XM_012972625.1) 的 *C3H* 基因相似性分别高达 91% 和 82%, 这与他们同属于管状花目植物的分类地位相一致; 采用 SOPMA 预测 *RgC3H* 蛋白二级结构表明该蛋白中主要由 α 螺旋和无规卷曲组成, 延伸链和 β 转角相对较少; 经信号肽预测分析得出该蛋白是一种膜外蛋白质, 无信号肽, 没有跨膜运输功能。

综上所述,本研究成功克隆并分析了地黄 *RgC3H* 基因,证明其属于植物 *C3H* 基因家族。本研究工作的开展,扩大了已知地黄基因数据,为下一步揭示 *RgC3H* 在地黄毛蕊花糖苷生物合成途径中的作用提供了有价值的基础数据。但是, *RgC3H* 合成地黄毛蕊花糖苷的真正作用有待进一步深入研究。

参考文献:

- ALUPIEVA K, KORKINA L, ORHAN IE, et al., 2014. Verbascoside—A review of its occurrence, (bio) synthesis and pharmacological significance [J]. *Biotechnol Adv*, 32: 1065–1076.
- HE LH, ZHAO SJ, HU ZB, 2008. Gene and function research progress of plant cytochrome p450s [J]. *Pharm Biotechnol*, 15(2): 142–147. [贺丽虹,赵淑娟,胡之璧,2008.植物细胞色素 p450 基因与功能研究进展 [J]. *药物生物技术*, 15(2): 142–147.]
- KIM YS, RYUK JA, KO BS, 2012. Discrimination of Korean *Rehmannia glutinosa* from Chinese *Rehmannia glutinosa* using sequence-characterized amplified region marker [J]. *J Korean Soc Appl boil*, 55(1): 1–6.
- LI G, YANG Q, ZHANG Y, et al., 2013. Cloning and sequence analysis of the *ckc3h* gene from *Caragana korshinskii* kom and preliminary studies of its function [J]. *China Biotechnol*, 33(4): 61–67.
- LI WT, DENG RX, JING XS, et al., 2019. Acteoside ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis through inhibiting peroxynitrite-mediated mitophagy activation [J]. *Free Radical Biol Med*. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.10.408.
- SCHOCH G, GOEPFERT S, MORANT M, et al., 2001. CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway [J]. *J Biol Chem*, 276(39): 36566–36574.
- SHAO LY, ZHOU YQ, YANG K, et al., 2018. Cloning and spatial expression of Triosephosphateisomerase gene in *Rehmannia glutinosa* [J]. *J Henan Agric Sci*, 47(11): 50–55. [邵露莹,周延清,柯珂,等,2018.地黄磷酸丙糖异构酶基因的克隆与空间表达 [J]. *河南农业科学*, 47(11): 50–55.]
- WANG FQ, ZHI JY, ZHANG ZY, et al., 2017. Transcriptome analysis of salicylic acid treatment in *Rehmannia glutinosa* hairy roots using RNA-seq technique for identification of genes involved in acteoside biosynthesis [J]. *Front Plant Sci*, 8(17): 787–801.
- WANG XN, 2017. Mining and identification of verbascoside biosynthesis associated genes based on transcriptome sequencing of *Rehmannia glutinosa* [D]. Xinxiang: Henan Normal

- University: 27–45. [王向楠, 2017. 基于转录组测序的地黄毛蕊花糖苷生物合成相关酶基因的发掘与鉴定 [D]. 新乡:河南师范大学: 27–45.]
- XIONG F, CHEN L, LIU TR, et al., 2018. Cloning and expression analysis of coumarate-3-hydroxylase *C3H* gene in *Punica granatum* [J]. *Mol Plant Breed*, 16(23): 7628–7633. [熊枫,陈磊,刘同瑞,等,2018.石榴对香豆酸-3-羟化酶 *C3H* 基因的克隆和表达分析 [J]. *分子植物育种*, 16(23): 7628–7633.]
- XIU ZM, PENG XP, CHEN JH, 2017. Effects of down-regulated expression of *Poplar* lignin synthesis genes *C3H* and *HCT* on cell wall spatial morphology [J]. *J Shandong Sci Technol*, 47(1): 37–40. [修则明,彭霄鹏,陈建辉, 2017.杨树木质素合成基因 *C3H* 与 *HCT* 表达下调对细胞壁空间形态的影响 [J]. *山东林业科技*, 47(1): 37–40.]
- YUAN YM, CHEN JR, LIU F, et al., 2017. Gene cloning, bioinformatics and expression analysis on *C3H* gene from *Boehmeria nivea* L. [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 33(32): 21–27. [袁有美,陈建荣,刘芳,等,2017.苾麻 *C3H* 基因的克隆、生物信息学分析及表达分析 [J]. *中国农学通报*, 33(32): 21–27.]
- ZHANG DD, 2018. Discovery and expressions of key verbascoside biosynthesis and glycolysis-associated enzyme genes in *Rehmannia glutinosa* [D]. Xinxiang: Henan Normal University: 25–28. [张丹丹,2018.地黄毛蕊花糖苷生物合成和糖酵解途径相关关键酶基因的挖掘和表达分析 [D]. 新乡:河南师范大学: 25–28.]
- ZHANG Y, 2014. Cloning and bioinformatics analysis of *Rgh-BNG*-like gene in *Rehmannia glutinosa* [D]. Xinxiang: Henan Normal University: 29–35. [张喻,2014.地黄 *RghBNG* 基因的结构分析和功能验证 [D]. 新乡:河南师范大学: 29–35.]
- ZHOU MJ, HU SL, CAO Y, et al., 2012. Cloning and bioinformatics analysis of *C3H* gene in *Neosinocalamus affinis* [J]. *Bull Bot Res*, 32(1): 38–46. [周美娟,胡尚连,曹颖,等,2012.慈竹 *C3H* 基因克隆及其生物信息学分析 [J]. *植物研究*, 32(1): 38–46.]
- ZHOU YQ, YANG K, ZHANG DD, et al., 2018. Metabolite accumulation and metabolic network in developing roots of *Rehmannia glutinosa* reveals its root developmental mechanism and quality [J]. *Sci Rep*, 8(1): 14127–14137.
- ZHOU YQ, WANG XN, WANG WS, et al., 2016. *De novo* transcriptome sequencing-based discovery and expression analyses of verbascoside biosynthesis-associated genes in *Rehmannia glutinosa* tuberous roots [J]. *Mol Breed*, 36(10): 139–149.
- ZHOU YQ, ZHANG Y, LI JY, et al., 2015. Cloning and bioinformatics analysis of cellulose synthase gene in *Rehmannia glutinosa* [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 1(43): 21–24. [周延清,张喻,李静云,等,2015.地黄纤维素合酶基因的克隆及生物信息学分析 [J]. *江苏农业科学*, 1(43): 21–24.]