

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2021.12.006

# 甜荞 *FePG1* 基因克隆及表达分析

方小梅<sup>1</sup>, 罗近瑜<sup>1</sup>, 黄科慧<sup>2</sup>, 刘洋<sup>1</sup>,  
徐鑫<sup>1</sup>, 张建<sup>1</sup>, 易泽林<sup>1</sup>

1. 西南大学农学与生物科技学院, 重庆 400715; 2. 古浪县防沙治沙技术推广中心, 甘肃 武威 733100

**摘要:** 基于前期转录组测序结果, 从自交不亲和甜荞乌克兰大粒荞材料中克隆了一个多聚半乳糖醛酸酶(Polygalacturonase PG)编码基因, 命名为 *FePG1*; 该基因 CDS 全长 1 215 bp, 编码 404 个氨基酸, 含有一个 PL-6 超家族保守结构域, 包含一个信号肽, 为稳定的疏水性跨膜蛋白。通过亚细胞定位检测发现 *FePG1* 基因主要在细胞膜和细胞质中表达, 推测 *FePG1* 蛋白为分泌蛋白并可能在甜荞花柱的形态形成上有重要功能。qRT-PCR 试验结果表明, *FePG1* 基因在甜荞盛花期的花中高表达, 且在短柱花雌雄蕊中高表达, 长柱花雌雄蕊中低表达, 推测甜荞 *FePG1* 基因可能与甜荞花柱异长发育有关。

**关键词:** 甜荞; PG 基因; 基因克隆; 表达分析

**中图分类号:** S517      **文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-9868(2021)12-0049-08

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



## Gene Cloning and Expression Analysis of *FePG1* in Common Buckwheat (*Fagopyrum esculentum*)

FANG Xiaomei<sup>1</sup>, LUO Jinyu<sup>1</sup>, HUANG Kehui<sup>2</sup>, LIU Yang<sup>1</sup>,  
Xu Xin<sup>1</sup>, ZHANG Jian<sup>1</sup>, YI Zelin<sup>1</sup>

1. College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Gulang County Sand Prevention and Control Technology Extension Center, Wuwei Gansu 733100, China

**Abstract:** A polygalacturonase gene, named as *FePG1*, has been cloned in the self-incompatible common buckwheat variety 'Ukrainian Daliqiao', based on our former transcriptome analysis result. *FePG1*, CDS full length 1 215 bp, encodes 404 amino acids, contains a signal peptide, which is a stable hydrophobicity protein and belongs to PL-6 superfamily protein domain. According to subcellular localization, *FePG1* is mainly expressed in cytomembrane and cytoplasm. It is speculated that *FePG1* protein is a secretory pro-

收稿日期: 2021-06-28

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目(SWU119070; XDJK2019D022; XDJK2019C038); 重庆市自然科学基金项目(cstc2018jcyjAX0394); 中国博士后科学基金项目(2017M622944)。

作者简介: 方小梅, 博士, 讲师, 主要从事荞麦重要性状基因挖掘及遗传解析。

tein and may play an important role in the style formation of common buckwheat. qRT-PCR showed that *FePG1* has high expression in flower of common buckwheat at the full-bloom stage. Especially, it has higher expression in S-morph Flower than L-morph Flower, which speculates that *FePG1* might be related to the style development of the self-incompatible common buckwheat.

**Key words:** common buckwheat; *FePG1*; Gene clone; expression analysis

多聚半乳糖醛酸酶(Polygalacturonase, PG)是一种参与多种植物发育过程的果胶消化酶。果胶是一种杂多糖,它是双子叶植物体细胞初生细胞壁的主要成分,同时也是花粉内壁和花粉管壁的主要成分,因此,参与果胶代谢相关酶和蛋白对植物的生长和生殖发育至关重要<sup>[1]</sup>。PG 基因属于植物中的大基因家族,在拟南芥<sup>[2]</sup>、杨树<sup>[3]</sup>、苹果<sup>[4]</sup>、葡萄<sup>[5]</sup>和玉米<sup>[6]</sup>等物种中均进行了 PG 家族基因的鉴定和表达模式研究。PG 基因参与植物发育的不同阶段,如种子萌发,器官脱落,莢和花药开裂,花粉粒成熟,花粉管生长,和木质部细胞形成<sup>[7]</sup>。在水稻中的超表达 PG 基因降低了果胶组分和细胞粘着力,同时,还增加了对非生物逆境的敏感性<sup>[8]</sup>;而在苹果中 PG 基因的超表达导致叶片形态发育不正常,果实脱落等表型<sup>[9]</sup>。PG 基因的表达水平在不同器官和组织中显著不同<sup>[10]</sup>,超过 50%的拟南芥 PG 基因在花卉组织中高度表达<sup>[11]</sup>。拟南芥中的 *PGX1* 参与细胞的伸长、膨胀和花的生长和发育;*PGX2* 能够促进拟南芥子叶下胚轴的伸长、叶的扩张、茎的木质化等;*QRT2*、*ADPG1* 和 *ADPG2* 对拟南芥生殖发育过程中花粉粒等不同的细胞分裂具有很重要的作用<sup>[12-14]</sup>。

目前,栽培甜荞均为自交不亲和的两型花作物,包括长柱花和短柱花,长柱花(L-morph Flower)也称“Pin”型花,具有长花柱和短雄蕊;短柱花(S-morph Flower)也称“Thrum”型花,具有短花柱和长雄蕊。这种花粉的互位方式减少了花粉的浪费,促进了异花授粉,提供了花粉的适应性<sup>[15]</sup>,同时,也极易受到环境影响,开花期出现阴雨天则会导致结实率降低而影响产量。国内外多个研究团队已利用自交可育野生荞麦 *Fagopyrum homotropicum*<sup>[16]</sup>,通过种间杂交的方式(*Fagopyrum esculentum* 和 *F. homotropicum*)培育出自交可育的等柱花甜荞,即花柱与雄蕊等长,且自交可育。依据实验室前期对甜荞长、短和等柱花雌雄蕊转录组数据,获得一个 PG 基因编码序列,命名为 *FePG1*,本研究拟对 *FePG1* 基因进行基因克隆,系统进化分析,亚细胞定位及表达模式分析,以期为今后验证甜荞 PG 基因家族成员调控甜荞花柱异长及作用机理提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

以花柱异长的自交不亲和甜荞品种乌克兰大粒荞和酉荞 2 号,花柱等长的自交亲和甜荞品种甜自 21 和贵甜 2 号为试验材料。种植于西南大学科研基地,于盛花期采集开花当日长势一致的花朵收集其雌雄蕊,置于-80℃冰箱中保存备用。此外,于盛花期取乌克兰大粒荞短柱花的根、茎、叶、花和幼嫩籽粒,置于-80℃冰箱中保存备用。

利用 Biospin 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒(博日,杭州)提取 RNA,再经琼脂糖电泳检测 RNA 降解和污染情况。用 RNA Nano 6000 Assay Kit of the Agilent 生物分析仪 2100 system (Agilent Technologies, CA, USA)检测 RNA 完整性,用 NanoPhotometer<sup>®</sup>分光光度计(IMPLEN, CA, USA)检测 RNA 的纯度,用 Qubit<sup>®</sup> RNA Assay Kit in Qubit<sup>®</sup> 2.0 荧光计(Life Technologies, CA, USA)检测 RNA 的浓度。利用 PrimeScript<sup>™</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)(TaKaRa, 北京)试剂盒进行 cDNA 的合成,于-80℃冰箱中保存备用。

### 1.2 甜荞 *FePG1* 基因克隆

实验室前期已利用乌克兰大粒荞长柱花、短柱花和甜自 21 等柱花雌雄蕊总 RNA 进行了转录组

测序, 分析测序结果发现 *FePG1* 基因在乌克兰大粒荞短柱花中高表达、在等柱花中不表达. 本研究以乌克兰大粒荞短柱花雌雄蕊 cDNA 为模板, 引物序列 FePG1-F(5'-ATGCCACGTTTTGGATTTG-TATG-3') 和 FePG1-R(5'-TAGCAGTGAACAGGAGGAAGC-3'), 利用 PrimeSTAR Max Premix(2X) 聚合酶(TaKaRa, 北京)进行 PCR 扩增. 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 用 SanPrep 柱式 DNA 凝胶回收试剂盒(Sangon Biotech, 上海)对扩增的目的片段进行回收. 将目的基因导入到 pMD19-T(TaKaRa, 北京)中, 经蓝白斑筛选, 挑取白色单菌落到 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LB(Luria-Bertani)液体培养基中培养后, 送至北京华大基因进行测序.

### 1.3 甜荞 *FePG1* 基因生物信息学分析

将测序正确的甜荞 *FePG1* 基因序列翻译成氨基酸, 通过 ExPASy-prosite (<http://www.expasy.org>) 分析甜荞 *FePG1* 基因的 CDS 序列保守结构域. 编码蛋白理化性质分析和蛋白亲水性预测利用在线工具 ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>)进行分析和预测; 编码蛋白的跨膜结构分析通过 TM-pred 工具([https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED\\_form.html](https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html))进行分析; 编码蛋白信号肽预测利用在线工具 SignalP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行预测. *FePG1* 基因的蛋白序列在 NCBI(National Center for Biotechnology Information)数据库中执行 BlastP 搜索(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). 选取来源于 30 个不同被子植物的 PG 同源蛋白, 采用 MEGA 7.0 软件的邻接法(NJ)构建蛋白序列的系统发育树.

### 1.4 甜荞 *FePG1* 基因的表达分析

分别以两个自交不亲和和甜荞品种乌克兰大粒荞和酉荞 2 号长柱花、短柱花雌雄蕊 cDNA 及两个自交亲和甜荞品种甜自 21 和贵甜 2 号等柱花雌雄蕊 cDNA 为模板, 用 Primer Primer 5.0 软件设计基因特异性引物 FePG1-F(5'-CCGGAATTCATGGCCACGTTTTGGATTTG-3') 和 FePG1-R(5'-TGCTCTAGATTAG-CAGTGAACAGGAGGAAGC-3'). 使用 TB Green<sup>TM</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒(TaKaRa, 北京)检测甜荞 *FePG1* 基因在不同花柱类型中的表达差异. 以乌克兰大粒荞短柱花的根、茎、叶、花和幼嫩籽粒 cDNA 为模板(PCR 反应体系和循环参数同上), 检测甜荞 *FePG1* 基因的组织表达情况.

### 1.5 甜荞 *FePG1* 基因的亚细胞定位

将本实验室保存的烟草种子播种至装满基质土的花盆(15 cm $\times$ 15 cm $\times$ 12 cm)中, 花盆置于光照培养箱中培养, 培养条件为光周期 16/8(光照/黑暗) h、温度 25  $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 60%, 待培养 4 周后备用. 根据目的基因 *FePG1* 的序列设计带有 StuI 酶切位点的引物 FePG1-F(5'-AAAAGGCCTATGGCCACGTTTTG-GATTTG-3') 和 FePG1-R(5'-TTTTCCGATTAGCAGTGAACAGGAGGAAGC-3'), 扩增 *FePG1* 基因的 ORF(开放阅读框)区域, 扩增产物经切胶回收. 用限制性内切酶 StuI 对 pH=7 LIC5.0-TET2rc-N-eGFP 进行单酶切. 酶切产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 回收纯化目的条带, 用 T4 连接酶将扩增产物和酶切产物经 12 h 连接, 而后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 12 h 培养, 挑取阳性克隆进行菌液 PCR 验证, 验证成功的单克隆子扩大培养, 提取重组质粒并进行酶切验证. 依据 pH=7 LIC5.0-TET2rc-N-eGFP 的 StuI 酶切骨架设计引物 F(5'-ACGTCTATATCATGGCCGACA-3') 和 R(5'-GTGACTCCCTTAATTCTCATGTATGATA-3'), 将得到重组质粒 pH=7 LIC5.0-N-eGFP-FePG1 测序验证. 将重组质粒 pH=7 LIC5.0-N-eGFP-FePG1 和对照质粒 pH=7 LIC5.0-TET2rc-N-eGFP 分别转化农杆菌感受态 GV3101. 将菌液进行 PCR 检测后再注射到烟草叶片背面, 经过常温黑暗处理 12 h 后观察叶片信号. 切取侵染 3 d 后的烟草叶片进行制片, 置于激光共聚焦显微镜下观察荧光在烟草下表皮细胞内的分布情况.

## 2 结果与分析

### 2.1 *FePG1* 基因克隆

利用前期的转录组数据, 以花柱异长的自交不亲和甜荞品种乌克兰大粒荞短柱花雌雄蕊 cDNA 为模

板, 通过 PCR 扩增得到 *FePG1* 基因(图 1a). 分析 *FePG1* 基因的 CDS 片段, 全长 1 215 bp, 编码 404 个氨基酸(图 1b). 相对分子质量为  $4.3 \times 10^4$ , 化学分子式为  $C_{1895}H_{3018}N_{508}O_{596}S_{18}$ , 等电点为 5.19. 其中包括 30 个亲水性氨基酸(Arg+Lys)、42 个酸性氨基酸(Asp+Glu)、39 个碱性氨基酸(Arg+Lys+His)和 132 个疏水性氨基酸(Ala,Lle,Leu,Met,Val). 使用 NCBI 中 Conserved Domains 对 *FePG1* 蛋白序列进行功能结构域分析, 结果表明该蛋白含有一个典型 PL-6(多糖裂解酶, 大多与果胶的形成及功能关系密切)超家族结构域(图 1c), 占该基因序列的 90%以上.

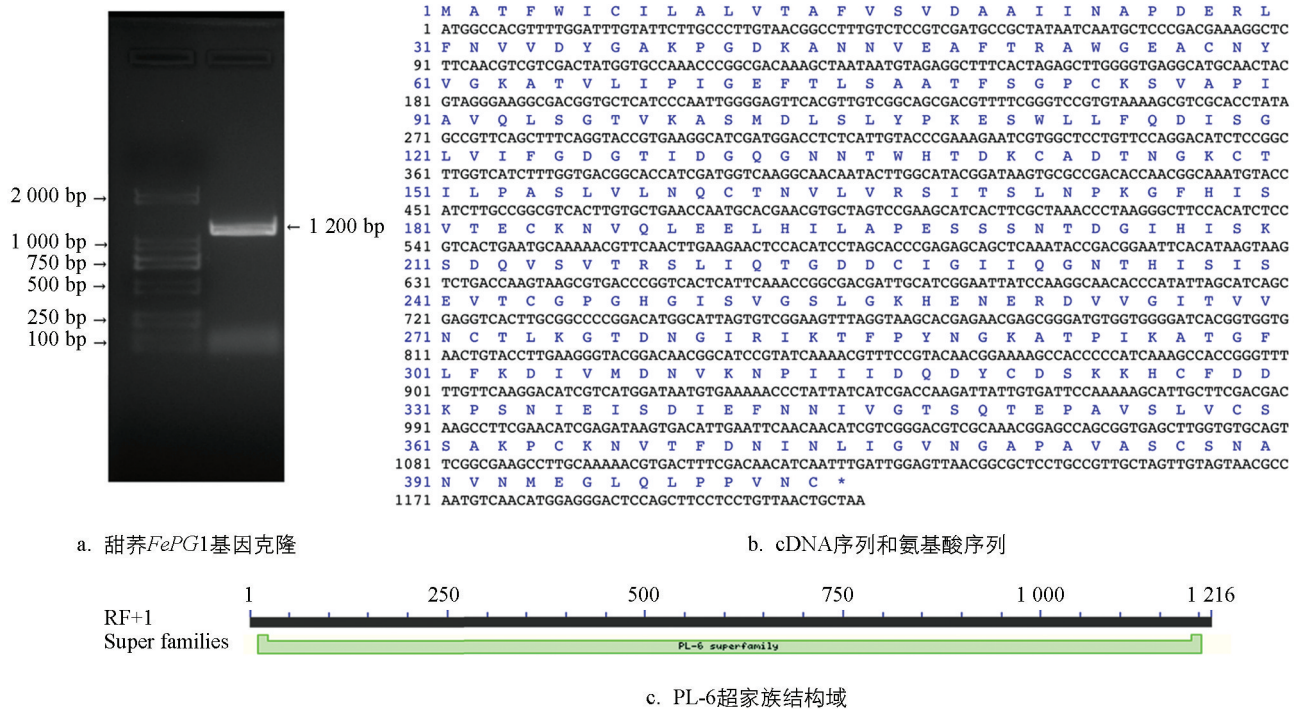


图 1 甜芥 *FePG1* 基因克隆(a)、cDNA 序列和氨基酸序列(b)和 PL-6 超家族结构域(c)

## 2.2 甜芥 *FePG1* 蛋白序列及分子系统发育分析

利用 ProtParam 预测得到 *FePG1* 蛋白亲水性平均系数为 +0.058, 脂肪族氨基酸指数为 95.30, 再利用 ProtScale 进一步分析疏水性氨基酸多于亲水性氨基酸, 疏水性最大值为 3.189(第 10 位和第 12 位的氨基酸), 最小值为 -2.467(第 259 位的氨基酸)(图 2a), 推测 *FePG1* 基因编码的蛋白为疏水性蛋白.

通过信号肽预测在线工具 SignalP 分析得出, *FePG1* 蛋白为信号肽的可能性为 0.999, 其他类型仅 0.001(图 2b). 因此, 该蛋白存在信号肽, 属于分泌性蛋白.

系统发育分析表明(图 2c), 甜芥 *FePG1* 蛋白与石竹目藜科作物甜菜、菠菜同源蛋白的亲缘关系较近, 其次为大戟科的橡胶树、木薯, 以及杨柳科的杨树、柳树等; 与拟南芥亲缘关系较远.

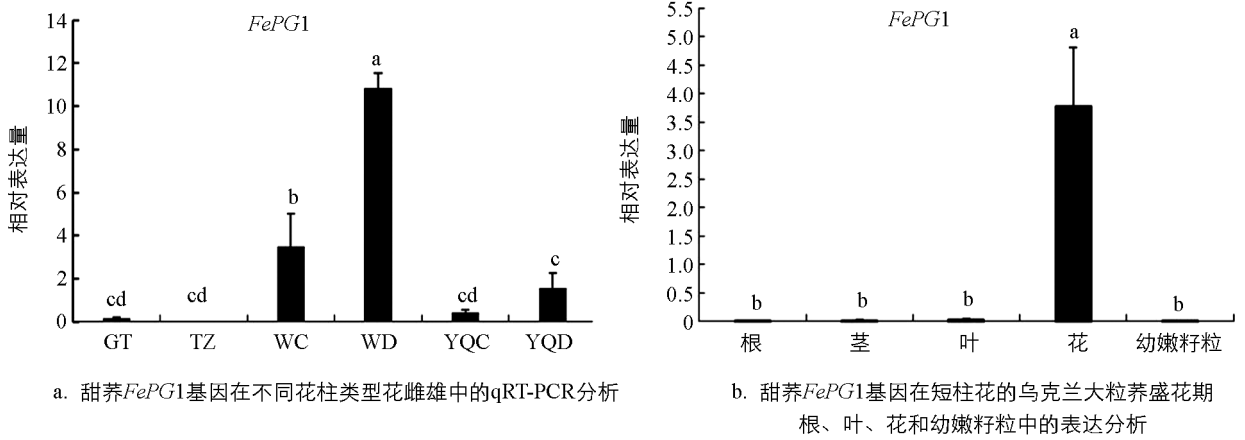
## 2.3 *FePG1* 基因的表达验证及表达模式分析

在课题组前期转录组数据基础上, 为了验证 *FePG1* 基因在甜芥中的表达情况, 本研究分别提取了盛花期乌克兰大粒芥长柱和短柱花雌雄蕊、甜自 21 等柱花雌雄蕊、西芥 2 号长柱和短柱花雌雄蕊、贵甜 2 号等柱花雌雄蕊进行验证. 通过 qRT-PCR 技术分析, 结果表明 *FePG1* 基因在自交亲和甜芥品种贵甜 2 号和甜自 21 的雌雄蕊中几乎不表达, 在自交不亲和甜芥乌克兰大粒芥和西芥 2 号中高表达, 且在短柱花雌雄蕊表达量均显著高于长柱花雌雄蕊(图 3a).

为了进一步分析 *FePG1* 基因的组织表达特异性, 提取盛花期乌克兰大粒芥的根、茎、叶、花和幼嫩籽粒通过 qRT-PCR 进行表达验证, 结果表明 *FePG1* 基因只在花中高表达, 在根、茎、叶和幼嫩籽粒中基本不表达(图 3b), 在甜芥花中特异性表达.







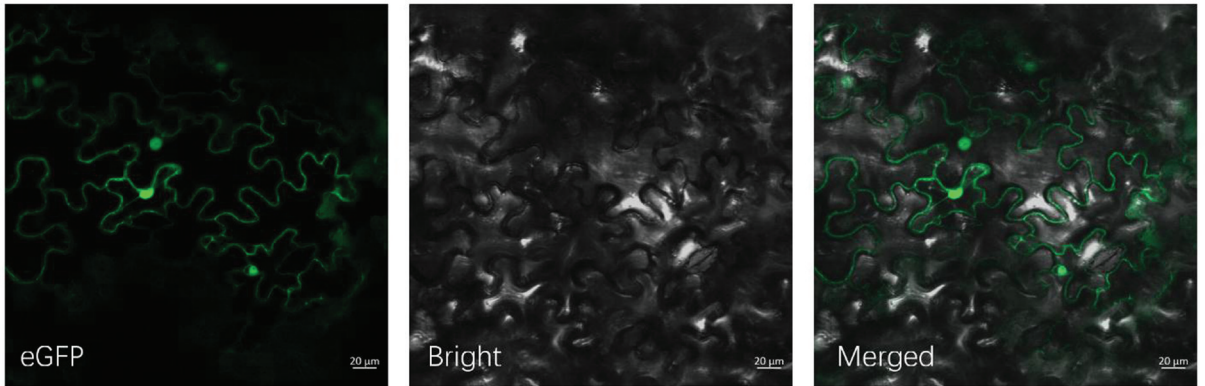
GT和TZ分别表示自交亲和等柱花甜荞品种贵甜2号(GT)和甜自21(TZ), WC和WD分别表示自交不亲和甜荞乌克兰大粒荞长柱花和短柱花, YQC和YQD分别表示自交不亲和甜荞酉荞2号长柱花和短柱花。

图 a 和图 b 中不同小写字母表示差异具有统计学意义 ( $p < 0.05$ )。

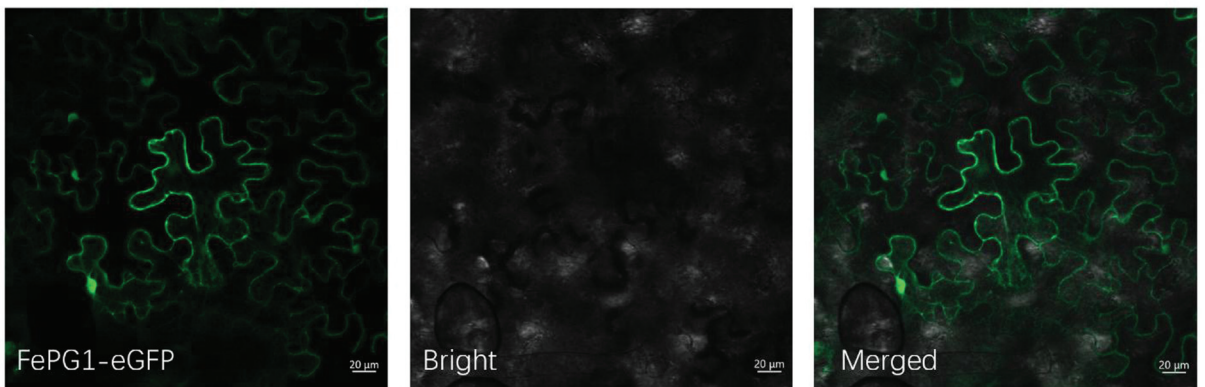
图 3 甜荞 *FePG1* 基因表达分析

## 2.4 *FePG1* 基因的亚细胞定位分析

*FePG1* 基因注释为转录因子, 为了在亚细胞水平上研究 *FePG1* 基因的表达情况, 利用注射法侵染烟草下表皮观察 *FePG1*-eGFP 融合蛋白和 eGFP 空载蛋白. 以 eGFP 空载蛋白为对照, 由于其在细胞中的定位没有特异性, 所以在细胞膜和细胞核中观察到荧光信号(图 4a). 在烟草叶片细胞中检测到 *FePG1*-eGFP 分布较多, 主要集中于细胞膜和细胞质中(图 4b).



a. eGFP空载蛋白位于细胞核和细胞膜中



b. *FePG1*-eGFP融合蛋白位于细胞膜和细胞质中

从左至右, 分别为 GFP 荧光、明场、GFP 荧光信号和明场叠加图。

图 4 *FePG1* 基因亚细胞定位

### 3 结论与讨论

甜荞属于蓼科荞麦属作物. 前人对荞麦属作物甜荞、苦荞和金荞麦籽粒转录组测序结果表明, 与荞麦属同源基因最多的物种是甜荞(23%)、葡萄(11.3%)<sup>[17]</sup>. 对甜荞花序<sup>[18]</sup>、籽粒<sup>[19]</sup>转录组测序结果表明甜荞与葡萄、碧桃、蓖麻、毛果杨亲缘关系较近. 本研究从甜荞雌雄蕊中克隆到的 *FePG1* 蛋白, 经系统发育分析, 与石竹目藜科作物甜菜、菠菜, 以及大戟科和杨柳科同源蛋白的亲缘关系较近, 与前人研究结果一致.

多聚半乳糖醛酸酶在细胞分离的生命周期过程中起着重要作用, 对拟南芥细胞壁修饰、脱落和开裂均有重要影响<sup>[12]</sup>. 50%以上拟南芥的 *PG* 基因在花组织中高表达<sup>[11]</sup>. 本文研究基于前期转录组测序克隆了一个 *FePG1* 基因, 利用两个自交亲和甜荞和两个自交不亲和甜荞为材料, qRT-PCR 实验表明 *FePG1* 基因在自交亲和甜荞雌雄蕊中不表达, 在自交不亲和甜荞中表达, 且其表达量在短柱花雌雄蕊中显著高于长柱花, 表明 *FePG1* 基因可能与甜荞自交不亲和有关, 且与花柱异长发育有关.

多聚半乳糖醛酸酶是 GH28 家族的果胶降解糖苷水解酶的重要成员之一, GH28 亚细胞定位显示存在针对分泌途径的信号序列<sup>[7]</sup>. 本研究通过亚细胞定位证明 *FePG1* 蛋白为存在于细胞膜和细胞质的跨膜蛋白, 与本实验 *FePG1* 蛋白的跨膜结构预测结果相吻合. 据此, 我们推断 *FePG1* 基因编码是一种存在于细胞膜和细胞质中的跨膜蛋白, 但是否与分泌途径有关系需进一步探究.

#### 参考文献:

- [1] 梁 颖. 植物 *PG* 基因进化的研究与白菜雄蕊发育相关的两个 *PG* 基因的表达分析和功能鉴定[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- [2] TORKI M, MANDARON P, MACHE R, et al. Characterization of a Ubiquitous Expressed Gene Family Encoding Polygalacturonase in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Gene*, 2000, 242(1): 427-436.
- [3] YANG Z L, LIU H J, WANG X R, et al. Molecular Evolution and Expression Divergence of the Populus Polygalacturonase Supergene Family Shed Light on the Evolution of Increasingly Complex Organs in Plants [J]. *New Phytol*, 2013, 197(4): 1353-1365.
- [4] CHEN H F, SHAO H X, FAN S, et al. Identification and Phylogenetic Analysis of the Polygalacturonase Gene Family in Apple [J]. *Horticultural Plant J*, 2016, 43(10): 1863-1877.
- [5] KHAN N, FATIMA F, HAIDER M S, et al. Genome-Wide Identification and Expression Profiling of the Polygalacturonase (*PG*) and Pectin Methylsterase (*PME*) Genes in Grapevine (*Vitis vinifera* L.) [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(13): 3180.
- [6] 刘 震, 赵丰舟, 崔 佳, 等. 玉米弯孢叶斑病菌 *PG* 基因家族鉴定与表达分析 [J]. *玉米科学*, 2018, 26(4): 166-172.
- [7] ANAND G, YADAV S, TANVEER A, et al. Genome-Wide Assessment of Polygalacturonases-Like (PGL) Genes of *Medicago truncatula*, *Sorghum bicolor*, *Vitis vinifera* and *Oryza sativa* Using Comparative Genomics Approach [J]. *Interdiscip Sci*, 2018, 10(4): 704-721.
- [8] LIU H, MA Y, CHEN N, et al. Overexpression of Stress-inducible OsBURP16, the Beta Subunit of Polygalacturonase 1, Decreases Pectin Content and Cell Adhesion and Increases Abiotic Stress Sensitivity in Rice [J]. *Plant Cell Environ*, 2014, 37(5): 1144-1158.
- [9] ATKINSON R G, SCHRODER R, HALLETT I C, et al. Overexpression of Polygalacturonase in Transgenic Apple Trees Leads to a Range of Novel Phenotypes Involving Changes in Cell Adhesion [J]. *Plant Physiol*, 2002, 129(1): 122-133.

- [10] TAMARI F, SHORE J S. Distribution of Style and Pollen Polygalacturonases among Distylous and Homostylous *Turnera* and *Piriqueta* Spp. (Turneraceae) [J]. *Heredity* (Edinb), 2004, 92(5): 380-385.
- [11] LYU M L, YU Y, JIANG J, et al. BeMF26a and BeMF26b Are Duplicated Polygalacturonase Genes with Divergent Expression Patterns and Functions in Pollen Development and Pollen Tube Formation in *Brassica campestris* [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0131173.
- [12] OGAWA M, KAY P, WILSON S, et al. ARABIDOPSIS DEHISCENCE ZONE POLYGALACTURONASE1 (ADPG1), ADPG2, and QUARTET2 Are Polygalacturonases Required for Cell Separation During Reproductive Development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2009, 21(1): 216-233.
- [13] XIAO C, SOMERVILLE C, ANDERSON C T. POLYGALACTURONASE INVOLVED IN EXPANSION1 Functions in Cell Elongation and Flower Development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2014, 26(3): 1018-1035.
- [14] XIAO C, BARNES W J, ZAMIL M S, et al. Activation Tagging of *Arabidopsis* Polygalacturonase Involved in Expansion2 Promotes Hypocotyl Elongation, Leaf Expansion, Stem Lignification, Mechanical Stiffening, and Lodging [J]. *Plant J*, 2017, 89(6): 1159-1173.
- [15] KAPPEL C, NGUYEN H C, LENHARD M. A Short Story Gets Longer: Recent Insights into the Molecular Basis of Heterostyly [J]. *J EXP BOT*, 2017, 68(21/22): 5719-5730.
- [16] OHNISHI O. Search for the Wild Ancestor Of Buckwheat i. Description of New *Fagopyrum* (Polygonaceae) Species and Their Distribution in China and the Himalayan Hills [J]. *Fagopyrum*, 1998(15): 18-28.
- [17] GAO J, WANG T T, LIU M X, et al. Transcriptome Analysis of Filling Stage Seeds among Three Buckwheat Species with Emphasis on Rutin Accumulation [J]. *PloS one*, 2017, 12(12): e0189672.
- [18] LOGACHEVA M D, KASIANOV A S, VINOGRADOV D V, et al. De Novo Sequencing and Characterization of Floral Transcriptome in Two Species of Buckwheat (*Fagopyrum*) [J]. *BMC Genomics*, 2011(12): 30.
- [19] SHI T X, LI R Y, CHEN Q J, et al. De Novo Sequencing of Seed Transcriptome and Development of Genic-Ssr Markers in Common Buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) [J]. *Mol Breeding*, 2017, 37(12): 147.

责任编辑 夏 娟