

## 分子谱系地理学在药用植物基因水平的研究进展

李 菁, 向婷婷, 许 成, 刘朝奇, 张长城, 袁 丁, 周志勇\*

三峡大学 中药药理学实验室, 湖北 宜昌 443002

**摘 要:** 分子谱系地理学在药用植物遗传多样性、中药道地性形成机制以及中药核心种质构建中的应用研究是目前我国中药研究的热点。近年来, 我国学者在中药资源领域深入到与 DNA 差异相关联的功能基因筛选和基因组学, 已对甘草 *Glycyrrhiza uralensis*、青蒿 *Artemisia caruifolia*、丹参 *Salvia miltiorrhiza* 等多种药用植物功能基因开展了深入研究。基于分子谱系地理学的药用植物功能基因筛选及中药材基因组学研究将会是今后研究应用的主流。对近年来分子谱系地理学在中药分子鉴定和中药道地性形成机制, 特别是药用植物功能基因筛选及基于此的基因组学方面研究进展进行综述。

**关键词:** 谱系地理学; 药用植物; 分子鉴定; 功能基因; 基因组学

**中图分类号:** R282.1      **文献标志码:** A      **文章编号:** 0253 - 2670(2015)08 - 1243 - 04

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.08.027

## Research progress in genes level of medicinal plants based on molecular phylogeography

LI Jing, XIANG Ting-ting, XU Cheng, LIU Chao-qi, ZHANG Chang-cheng, YUAN Ding, ZHOU Zhi-yong

Key Laboratory of Chinese Medical Pharmacology, China Three Gorges University, Yichang 443002, China

**Abstract:** Phylogeography is a hot point in the field of Chinese materia medica (CMM) in the study on the genetic diversity of medicinal plants, geo-herbs formation mechanisms, and the construction of core collection. In recent years, the scholars in China studied the functional gene screening and the genomics associated with DNA differences in the field of CMM resources. And they have in-depth studied the functional genes of *Glycyrrhiza uralensis*, *Artemisia annua*, *Salvia miltiorrhiza*, and other medicinal plants. It will be the mainstream for functional gene screening of medicinal plants based on molecular phylogeography and geo-herbs genomics in the future researches and applications. In the paper, the authors review the recent progress in molecular phylogeography in the molecular identification of CMM, the formation mechanism of CMM genuineness, particularly the medicinal plant functional genes screening on which the genomic study is carried, and so on.

**Key words:** phylogeography; medicinal plants; molecular identification; functional genes; genomics

我国中药野生资源分布广泛, 质量差异较大, 而栽培品大部分缺乏有效的质量控制, 中药有效成分复杂多样, 很大程度上增加了中药研究的难度。在中医药现代化及国际化进程中, 需要首先解决中药资源的来源鉴定及质量控制问题, 在此方面, 亟待解决的问题主要包括: ①如何从分子水平找到评价中药道地性的指标, 即基于分子生物学的药材产地鉴别; ②中药道地性与非道地性的相关性, 即中药道地性形成机制; ③中药有效组分体内合成路径

中功能基因的筛选, 即中药功能基因关联的中药品质鉴定。随着分子生物学方法、统计分析技术的普及和长足发展, 分子谱系地理学研究方法为药用植物研究提供了新的思路。

谱系地理学 (phylogeography) 是 Avise 等<sup>[1]</sup>于 1987 年提出的一门研究近缘物种间或种内水平的谱系地理分布原理和过程的新兴交叉学科, 主要探讨一个物种的基因谱系当前地理分布格局的历史成因。由于结合了时间和空间尺度, 谱系地理学在

收稿日期: 2014-08-28

基金项目: 湖北省自然科学基金项目——鄂西区域特色中草药药效物质基础研究 with 资源保护利用 (2013CFA014); 湖北省自然科学基金项目——基因条形码与药效相关方法优化竹节参种质资源 (2014CFB430)

作者简介: 李 菁, 男, 硕士在读, 研究方向为中药分子鉴定与质量评价、药效物质基础筛选。Tel: (0717)6396818 E-mail: lj19881228@outlook.com

\*通信作者 周志勇, 男, 博士, 讲师, 硕士生导师, 主要从事中药分子鉴定与质量评价、药效物质基础筛选研究。

Tel: (0717)6396818 E-mail: in\_bud@ctgu.edu.cn

研究种内进化过程中成为最能反映历史过程的基本处理方法<sup>[2]</sup>。

近几年,随着分子谱系地理学在濒危、珍贵植物种群分布、迁移及濒危机制研究中的不断深入,已为植物居群演化规律的研究提供了全新的理论指导,并且实现了对多个濒危物种的有效保护等。研究者进一步将分子谱系地理学方法深入到对药用植物遗传多态性、药材道地性的遗传机制、药用植物核心种质构建及药用植物功能基因的筛选等方面,在药用植物资源领域成为新的研究热点。

## 1 分子谱系地理学

分子谱系地理学研究的核心在于探讨遗传变异当前地理格局的历史成因,其重要的基础理论之一为溯祖理论(coalescent theory)。溯祖理论是探讨追溯等位基因共同祖先过程中谱系变化的数学和统计学理论,为遗传漂变历程的反向理论,即依据现存居群中存在的中性遗传变异,回推出此变异如何产生的历史过程,即回推至共同祖先基因型所经历的历史事件。目前在国际上分子谱系地理学已成为研究居群遗传分化和进化历史的热点和亮点。

2002 年以来,分子谱系地理学研究主要集中在一些珍稀濒危植物的进化历史和保护<sup>[3]</sup>以及栽培作物起源等方面的研究,如闫小玲<sup>[4]</sup>对我国甘肃、河南、安徽、广东省,以及日本等地银杏 *Ginkgo biloba* Linn. 进行了 cpDNA 单倍型分析及微卫星标记筛选结合基于 SSR 的银杏群体遗传结构分析,探讨了银杏的遗传多样性、地理分布格局历史成因及濒危保护策略; Zhang 等<sup>[5]</sup>对南方红豆杉 *Taxus chinensis* (Pilger) Relhd. var. *mairei* (Lemee et Lév.) Cheng et L. K. Fu 叶绿体全基因进行了测序,得到包含 9 个内含子片段的 113 个单拷贝基因,并在和相关被子植物、裸子植物、蕨、地钱的对比研究中发现其单拷贝区丢失了一个较大的反向互补重复区; 银露梅 *Potentilla glabra* Lodd.<sup>[6]</sup>、露蕊乌头 *Aconitum gymnantrum* Maxim.<sup>[7]</sup>、伞花木 *Eurycorymbus cavaleriei* (Lévl.) Rehd. et Hand. -Mazz.<sup>[8]</sup>等植物也见相关谱系地理学研究报道。近几年,分子谱系地理学在药用植物遗传多样性、地理分布格局历史成因、迁移、濒危机制等方面的研究越来越受到重视。分子谱系地理学研究方法主要用到的是 DNA 分子标记技术,包括随机扩增多态性 DNA (RAPD)、序列特异扩增区域 (SCAR)、限制性片断长度多态性 (RFLP)、扩增片断长度多态性 (AFLP)、简单重复

序列间扩增 (ISSR) 等分子生物学技术<sup>[9]</sup>。分子谱系地理学最早应用分子方差分析方法统计种群遗传多样性及遗传分化参数,近年来结合统计分析技术发展出了嵌套分支分析 (NCA),这一分析方法能够对居群的动态结构和历史事件发生的过程和时间顺序有一清晰的认识,全面地反映居群的进化历史<sup>[3]</sup>。

## 2 分子谱系地理学在药用植物研究中的应用

### 2.1 中药材分子鉴定

我国中药材由于人工栽培和人工定向选择以及野生品种基因漂变等原因,其种质资源在形态特征、内在质量和产量等方面均有较大差异。分子谱系地理学通过分析叶绿体基因组内含子,同时采用 DNA 测序和单核苷酸多态性分析能够得到非道地与道地药材之间甚至各个种质之间的 DNA 差异<sup>[2,9]</sup>。郭宝均<sup>[10]</sup>运用 RAPD 分子标记技术对小毫菊、杭白菊、大毫菊、特种毫菊、滁菊、杭黄菊 6 种供试菊花进行了多态性分析,对这 6 种菊花品种进行了有效聚类分析,其中小毫菊、特种毫菊、大毫菊可聚为一大类;杭白菊和杭黄菊聚为一类;滁菊单独为一支,从中可以得到小毫菊与特种毫菊聚为亲缘关系极近的一小类;王含彦等<sup>[11]</sup>利用筛选出的 12 个条带清晰的多态性引物对 15 份黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge 根部材料进行 RAPD 分析,比较了各组间 Nei's 遗传距离及各组 Shannon's 信息指数,得出地理来源相近的材料具有更为相似的遗传背景这一结论。

### 2.2 中药材道地性机制研究及功能基因的确定

基于分子谱系地理学研究的道地药材分子鉴定,不仅在于能够对有明显 DNA 差异的道地药材进行准确的分子鉴定,更重要的是能够判断出道地药材是否有明显 DNA 差异“烙印”,并对没有明显 DNA 差异“烙印”的道地药材阐明其遗传上的原因,探讨中药材道地性形成机制<sup>[2]</sup>。刘颖等<sup>[12]</sup>运用 Southern 杂交、实时定量 PCR 等技术研究了甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (HMGR)、鲨烯合成酶 (SQS)、 $\beta$ -香树酯醇合成酶 ( $\beta$ -AS) 基因多态性及这 3 个功能基因的拷贝数组合多态性与甘草产地、形态及甘草酸量的关联性,并指出甘草 3 个功能基因的拷贝数多态性及组合多态性与产地相关性,可能成为解析道地药材形成机制的关键因素之一。刘晓光等<sup>[13]</sup>运用分子谱系地理学方法探讨了黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 及黄连 *Coptis chinensis* Franch.

原植物资源的遗传多态性和地理分布格局历史成因,提出并展望了基于分子谱系地理学的野生资源丰富和野生资源已丧失的药用植物核心种质构建的应用前景。席培宇等<sup>[14]</sup>通过探讨研究  $\beta$ -AS 单基因多态性及表达量差异的相关性,得出  $\beta$ -AS 基因序列差异,特别是内含子的序列差异可能是导致甘草道地性形成的原因之一。张雪梅等<sup>[15]</sup>通过检测青藏高原多年生草本植物青海当归 *Angelica nitida* Wolff 16 个居群 147 份个体的 ITS 的序列变异阐明了青海当归的地理分布格局历史成因,并且解释了第四纪冰期气候波动与该物种迁移-扩张-再迁移-再扩张的关系。陈晓辰等<sup>[16]</sup>通过探讨特定环境中微生物群体 DNA 的多态性,研究了植物根际微生态系统与道地药材形成机制及解决药用植物连作障碍的问题。

生物体内存在着多种多样的基因,其功能各异,指导合成有特异功能的酶,对生物代谢活动及次生代谢产物等进行调控,它们相互协同作用共同完成生命过程<sup>[17]</sup>。向礼恩等<sup>[18]</sup>采用 qRT-PCR 技术对不同组织中涉及青蒿素合成途径的 7 个功能基因 (HMGR、DXR、FPS、ADS、CYP71AV1、CPR、AAR) 的表达水平进行了分析,得出花可能是青蒿素前体合成的主要部位,其中来自于 2-甲基-D-赤藓糖醇 4-磷酸 (MEP) 途径的 DXR 对于青蒿素积累具有较大贡献; ADS 在各组织中的表达量与青蒿素的量完全一致,表现为正相关,表明 ADS 在青蒿素合成中起到重要作用,是该途径遗传改造的重要靶点。据报道香叶基香叶基二磷酸合成酶 (GGPPS) 基因编码蛋白具有 GG-PP 合酶的活性,推测其可能是丹参中二萜类物质合成的主要合酶。化文平等<sup>[19]</sup>从丹参中克隆出一条新的 GGPPS 基因 (SmGGPPS3),通过推测氨基酸序列实时定量 PCR 以及遗传互补实验说明 SmGGPPS3 编码蛋白具有 GG-PP 合酶的活性。另外,SmGGPPS3 在根部的表达最高,这与丹参中丹参酮类物质主要在丹参根部分布的特点类似,预示其很可能在丹参酮的合成中起着关键的作用。SQS 及  $\beta$ -AS 是甘草酸生物合成途径中的 2 种关键酶,刘颖等<sup>[20]</sup>探讨了研究了 3 种不同的 SQS1 基因和  $\beta$ -AS 基因在酿酒酵母中的共表达,通过 TLC 及 GC-MS 检测代谢产物  $\beta$ -香树脂醇的量。结果显示 SQS1 基因与  $\beta$ -AS 基因共表达有助于代谢产物  $\beta$ -香树脂醇的积累,其中以 SQS12 为最好。

### 3 分子谱系地理学在功能基因相关联的“基因组学”的研究

近年来,药用植物基因组学研究已经取得了长足的进步。例如:中国医学科学院药用植物研究所陈士林教授在全国第 9 届天然药物资源学术研讨会上提出本草基因组计划策略,是针对药用植物进行的全基因组测序和后基因组学研究的系列计划,并将丹参、人参 *Panax ginseng* C. A. Mey.、三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 等列入计划的第一批测序物种<sup>[21]</sup>。Lukas 等<sup>[22]</sup>对作为新兴的纯天然食物和抗氧化剂的药用植物牛至 *Origanum vulgare* L. 的全叶绿体基因组序列进行了详细研究,发现仅由核苷酸 A 或 T 构成的 27 个完整单核苷酸片段,有 32 个二核苷酸片段和 2 个三核苷酸片段;与唇形目另外 2 种重要植物的叶绿体 DNA 比较发现,其含有一对一大一小的反向互补重复序列。李西文等<sup>[23]</sup>应用 454 高通量测序技术对厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. 进行了叶绿体全基因组测序,结果表明研究建立的标准测序流程适用于叶绿体基因组测序,叶绿体基因组序列可有效区分厚朴及近缘物种。梁鑫明等<sup>[24]</sup>对杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. DNA 样本进行随机打断,采用新一代高通量测序技术测序,滤过低质量数据,对处理后数据进行 17-mer 分析,得出杜仲基因组的大小为 1.04 Gb,无明显的杂合率且重复序列量较高。这为杜仲全基因组图谱绘制方案的制定提供了重要依据。

中国医学科学院药用植物研究所提出“本草基因组计划”以来,已形成了以中药种质为对象的中药 DNA 条形码鉴定和中药基因组学的新方法体系。基于分子谱系地理学方法掌握的药用植物基因组,可以确定药用植物中哪些基因决定着药效,这些基因是如何发挥作用的,进而可以实现对中药的标准化生产,在新品种培育中可以通过人工定向选择保持药材的“道地血统”,将使得药品疗效更好、质量更优。吴波<sup>[25]</sup>通过对吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. 超氧化物歧化酶 (SOD) 基因片段克隆及单核苷酸多态性 (SNP) 分析,研究得出编码亲水性酸性氨基酸的基因为 Cu/Zn-SOD 基因,编码亲水性碱性蛋白的为 Mn/Fe-SOD 基因,这一成果为提高吴茱萸抗旱能力以及抗旱新品种选育奠定理论基础。邢朝斌等<sup>[26]</sup>通过刺五加 *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim. SS 和 SE 基因 SNP 位点与刺五加总皂苷量的相关性研究,得出刺

五加 SS 和 SE 基因存在 SNP, SE 基因 164~285 bp 位点的 AGAACG 与刺五加总皂苷高量组显著相关, TAGTTC 与低量组显著相关的结论。刘颖等<sup>[27]</sup>通过构建的 4 种 HMGR 基因突变型表达载体, 研究了 HMGR 基因多态性对产物甲羟戊酸积累的影响, 并确定了 GA 插入型突变的酶催化效率要明显高于 L/V 型突变。

#### 4 展望

近几年, 一方面, 随着分子生物学方法、统计分析技术的普及和长足发展, 分子谱系地理学在药用植物研究中的应用越来越系统化; 另一方面, 代谢组学、转录组学、基因组学和生物信息学等多学科理论的交叉与融合极大促进了一些关键因子、关键基因的研究。但是, 目前大部分中药材基于分子谱系地理学的中药种质多样性和中药功能基因研究、与功能基因相关的中药有效成分研究仍然没能有机地整合起来。未来中药材研究, 不仅要努力在全部中药原材料普及 DNA 条形码技术, 发现更多的功能基因, 或者是调控其活性成分的生物合成, 更需要以分子谱系地理学构建的中药材核心种质及系统进化谱系为基础, 以药用植物基因组框架图的支持, 结合各种“组”学和药物化学、生物信息学等学科综合研究。真正建立起中药材科学完备的资源体系和鉴定体系, 方便中药材的研究、管理、经营, 使中药材走出国门, 走向世界。

#### 参考文献

- [1] Avise J C. *Phylogeography: the History and Formation of Species* [M]. Cambridge: Harvard University Press, 2000.
- [2] 袁庆军, 黄璐琦, 邵爱娟, 等. 展望分子谱系地理学在道地药材研究中的应用 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(16): 2007-2011.
- [3] 徐刚标. 种内谱系地理学及在植物遗传多样性保护中的应用 [J]. 中南林业科技大学学报, 2011, 31(12): 1-6.
- [4] 闫小玲. 基于 cpDNA 单倍型和 SSR 分析的银杏群体遗传结构和谱系地理学研究 [D]. 杭州: 浙江大学生命科学学院, 2010.
- [5] Zhang Y Z, Ma J, Yang B X. The complete chloroplast genome sequence of *Taxus chinensis* var. *mairei* (Taxaceae): Loss of an inverted repeat region and comparative analysis with related species [J]. *Gene*, 2014, 540(2): 201-209.
- [6] Wang L Y, Ikeda H, Liu T L, et al. Repeated range expansion and glacial endurance of *Potentilla glabra* (Rosaceae) in the Qinghai-Tibetan plateau [J]. *J Integ Plant Biol*, 2009, 51(7): 698-706.
- [7] Wang L, Abbott R J, Zheng W, et al. History and evolution of alpine plants endemic to the Qinghai-Tibetan Plateau: *Aconitum gymnantrum* (Ranunculaceae) [J]. *Mol Ecol*, 2009, 18(4): 709-721.
- [8] Wang J, Gao P, Kang M, et al. Refugia within refugia: the case study of a canopy tree (*Eurycorymbus cavaleriei*) in subtropical China [J]. *J Biogeogr*, 2009, 36(11): 2156-2164.
- [9] 张文龙, 曾桂萍. 分子标记技术及其在中药石斛研究中的应用进展 [J]. 基因组学与应用生物学, 2014, 33(2): 452-457.
- [10] 郭宝均. RAPD 标记在药用菊花种质鉴定中的应用 [J]. 北方药学, 2014, 11(2): 12-13.
- [11] 王含彦, 陈瑾歆, 胥正敏, 等. 药用黄芪的遗传多样性 RAPD 分析 [J]. 四川中医, 2010, 28(6): 56-58.
- [12] 刘颖, 刘东吉, 刘春生. 基于 HMGR、SQS1、 $\beta$ -AS 基因 CNVs 的甘草道地性机制研究 [J]. 药学报, 2012, 47(2): 250-255.
- [13] 刘晓光, 黄璐琦, 袁庆军, 等. 基于分子谱系地理学的药用植物核心种质构建 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(5): 692-698.
- [14] 席培宇, 刘颖, 陈宏昊. 基于  $\beta$ -AS 基因的甘草道地性形成机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8): 153-158.
- [15] 张雪梅, 何兴金. 青藏高原特有植物青海当归的谱系地理学初探 [J]. 植物分类与资源学报, 2013, 35(4): 505-512.
- [16] 陈晓辰, 宋经元, 董林林, 等. 宏基因组学与道地药材研究 [J]. 中草药, 2012, 43(12): 2315-2320.
- [17] 吴健, 刘学, 王永红. 植物重要功能基因研究进展及其应用 [J]. 生命科学, 2011, 23(2): 168-178.
- [18] 向礼恩, 严铮辉, 王贵君, 等. 青蒿素生物合成途径基因组织表达分析与青蒿素积累研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(9): 1169-1173.
- [19] 化文平, 宋双红, 智媛, 等. 丹参 SmGGPPS3 基因的克隆及表达分析 [J]. 植物科学学报, 2014, 32(1): 50-57.
- [20] 刘颖, 陈宏昊, 文浩, 等. 甘草鲨烯合酶 1 基因多态性及其与  $\beta$ -香树脂醇合成酶共表达对  $\beta$ -香树脂醇积累的影响研究 [J]. 药学报, 2014, 49(5): 734-741.
- [21] 陈士林, 孙永珍, 徐江, 等. 本草基因组计划研究策略 [J]. 药学报, 2010, 45(7): 807-812.
- [22] Lukas B, Novak J. The complete chloroplast genome of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) [J]. *Gene*, 2013, 528(2): 163-169.
- [23] 李西文, 胡志刚, 林小涵. 基于 454FLX 高通量技术的厚朴叶绿体全基因组测序及应用研究 [J]. 药学报, 2012, 47(1): 124-130.
- [24] 梁鑫明, 王军一, 徐讯. 杜仲全基因组调查 [A] // 第十届全国药用植物及植物药学术研讨会 [C]. 昆明: 中国植物学会, 2011.
- [25] 吴波. 吴茱萸种质资源遗传多样性及抗旱生理研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2013.
- [26] 邢朝斌, 劳风云, 龙月红. 刺五加鲨烯合酶和鲨烯环氧酶基因单核苷酸多态性及其与总皂苷量的相关性研究 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 2020-2024.
- [27] 刘颖, 许巧仙, 王学勇. 甘草 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶基因多态性对其编码酶催化效率的影响 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(24): 3784-3788.