

遮阴对地黄块根性状、光合特性及基因转录的影响

王丰青¹, 李欣容¹, 杨超飞¹, 智惊宇¹, 张雪丽¹, 古力², 谢彩侠³, 张重义^{1,2*}

1. 河南农业大学农学院, 河南 郑州 450046

2. 福建农林大学作物科学学院, 福建 福州 350002

3. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046

摘要:目的 分析遮阴对地黄块根性状和叶片光合特性的影响, 并通过转录组测序阐明遮阴抑制地黄块根膨大的分子机制。方法 对地黄进行全光照、60%遮阴、90%遮阴处理, 测块根性状及光合特性。利用高通量测序技术对 90%遮阴处理和自然光照的地黄块根进行转录组测序, 筛选差异表达的基因, 同时, 利用实时荧光定量 PCR 对部分基因在根和叶中的表达特性进行分析。结果 遮阴后块根长度、直径和单株块根产量均显著降低, 90%遮阴处理块根几乎不膨大。地黄块根中薄壁细胞层数减少, 导管比例升高。随遮阴程度增加叶绿素 a、b 及总叶绿素含量逐渐降低, 光合能力下降。转录组分析共获得 3 348 个差异表达的基因, 其中 1 396 个下调, 1 952 个上调; 通过 KEGG 代谢通路富集分析, 将遮阴后差异表达的 1 668 个基因 (53.4%) 富集到 117 个代谢通路中, 其中 17 个代谢通路富集达到显著水平。植物激素信号传导通路最先得到富集, 其次是植物病原菌互作通路, 苯乙醇苷生物合成通路、淀粉和蔗糖代谢通路也得到了显著富集。在激素信号通路中, 多数基因表达上调。遮阴后差异表达的 16 个扩展蛋白基因中 11 个表达下调, 仅有 5 个表达上调, 与淀粉降解有关的 2 个 β -淀粉酶 (Bmy) 基因均表达上调, 而蔗糖磷酸合成酶基因 (SPS) 表达下调, 参与木质素合成的多数基因表达下调, 纤维素合成基因多数表达上调。结论 遮阴后地黄光合能力下降, 光合产物减少, 地黄通过一系列激素通路基因的差异表达对遮阴作出响应调控, 使块根膨大受阻。

关键词: 地黄; 遮阴; 块根; 膨大; 基因表达

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)18-4419-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.18.023

Effects of shading on tuberous root traits, photosynthetic characteristics and gene transcription of *Rehmannia glutinosa*

WANG Feng-qing¹, LI Xin-rong¹, YANG Chao-fei¹, ZHI Jing-yu¹, ZHANG Xue-li¹, GU Li², XIE Cai-xia³, ZHANG Zhong-yi^{1,2}

1. College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China

2. College of Crop Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

3. School of Medicine, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Objective To reveal the effects of shading on tuberous root and photosynthetic characteristics of *Rehmannia glutinosa*, and analyze the molecular mechanism of shading affecting the expansion of *R. glutinosa* tuberous root by transcriptome sequencing. **Methods** *R. glutinosa* plants were treated with full light, 60% shading and 90% shading. High-throughput sequencing was used to sequence the transcriptome of the *R. glutinosa* tuberous roots treated with full-light and 90% shading, and the differentially expressed genes were screened out. The expression characteristics of some genes in tuberous roots and leaves were analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** After shading, the number of parenchyma cell layers in the tuberous roots was decreased, but the proportion of ducts was increased, the length, diameter and fresh weight of tuberous roots were decreased significantly, and the tuberous roots barely expanded under 90% shading treatment. The number of parenchyma cell was decreased and the proportion of duct was increased in root tubers of *R. glutinosa*. With the increase of shading degree, the content of chlorophyll a and b and total chlorophyll content were gradually decreased, and photosynthetic capacity was decreased. A total of 3 348 differentially expressed genes were obtained by transcriptome analysis, of which 1 396 were down-regulated and 1 952 were up-regulated. Through enrichment analysis of KEGG metabolic pathway, 1 668 differentially expressed genes (53.4%) were enriched into 117 metabolic pathways, and

收稿日期: 2019-03-06

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFC1700705); 国家自然科学基金资助项目 (81872950); 国家自然科学基金资助项目 (81473299)

作者简介: 王丰青, 博士, 副教授, 主要从事药用植物资源创新与分子生物学研究。E-mail: heauzyxcw@126.com

*通信作者 张重义, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药资源生态与中药材生产技术研究。Tel: (0591)83742793 E-mail: zy Zhang@fafu.edu.cn

17 of them were significantly enriched pathways. The plant hormone signaling pathway was enriched firstly, followed by the plant pathogen interaction pathway, the phenylethanoid glycoside biosynthesis pathway, starch and sucrose metabolic pathways were also enriched significantly. In the hormone signaling pathway, most of different expressed genes were up-regulated. Eleven expansin genes were down-regulated under 90% shading, only five expansin genes were up-regulated. Two of beta-amylase genes (Bmy) related to starch degradation were up-regulated when shading treated, while the sucrose phosphate synthase genes (SPS) were down-regulated. Most of the genes involved in lignin synthesis were down-regulated and most of the genes involved in cellulose synthesis were up-regulated. **Conclusion** The photosynthetic capacity of *R. glutinosa* was decreased under shading conditions, and led to the accumulation of photosynthate decreased in its leaf and tuberous root. *R. glutinosa* plant responded to shading by regulating the differential expression of a series of hormone pathway genes, which prevent the expansion of tuberous roots.

Key words: *Rehmannia glutinosa* Libosch.; shading; tuberous root; expansion; gene expression

光影响植物的生长发育和分布,是植物生长必需的环境因子。近年来有较多研究关注光照强度对植物生长发育^[1-2]、生理代谢^[3]、光形态建成^[4-6]、干物质分配^[7]和次生代谢产物积累^[8-9]的研究。关于植物光照响应的分子机制研究主要集中在拟南芥、水稻等模式植物上,如紫外线(UV)通过调控 UVR8、COP1、CRY1、AGB1 和 HY5 等蛋白控制拟南芥幼苗的形态建成^[10-11]。弱光条件下,植物通过增加单叶面积,减少叶片厚度,增加叶干质量,减少根冠比以适应光照的减弱^[12-13]。遮阴会降低作物籽粒产量^[14-15],提高或降低药用植物特定药效成分的含量^[16-17]。研究遮阴对于分析药用植物产量形成规律、药效成分合成机制及制定科学的栽培措施具有重要的意义。

地黄 *Rehmannia glutinosa* L. 是玄参科植物,以块根入药,是著名的“四大怀药”之一。地黄富含环烯醚萜苷、苯乙醇苷、紫罗兰酮、三萜、黄酮、酚酸和多糖等多种化合物,具有保护神经、抗心脑血管疾病、增强免疫、抗糖尿病及其并发症、抗骨质疏松等多种药理作用^[19]。其道地产区是古“怀庆府”,即河南焦作地区,在我国北方山西、山东、河北等多个地区也有较大的种植面积^[20]。地黄是喜光植物,生长过程中需要充足的光照,光照不足不但影响块根发育^[21],也影响其活性成分的含量^[22]。然而,关于遮阴对地黄块根发育规律及其响应遮阴的分子机制研究迄今未见报道。

本实验拟通过对大田生长的地黄植株进行人工遮阴处理,并应用转录组测序技术分析遮阴后块根膨大发育受阻的分子机制,以期对地黄的规范化种植和新品种选育提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料处理

供试材料为地黄“温 85-5”,经河南中医药研

究院张留记研究员鉴定为 *Rehmannia glutinosa* L., 在河南农业大学百草园进行种植,播种时间为 2014 年 4 月 24 日,管理方式与大田管理保持一致。地黄出苗 30 d 后进行遮阴处理,以 80~100 株为 1 组,共分为 3 组,其中 2 组分别进行 60%遮阴和 90%遮阴处理,另外 1 组为对照。分别在遮阴后 30、60、150 d 时随机选取 10 株生长一致的地黄植株,测量其块根长度、直径、单株鲜质量和折干率,同时取遮阴后 30 d 的块根进行石蜡切片观察,取 90%遮阴和全光照处理的块根用液氮速冻进行保存,用于转录组测序分析。

1.2 RNA-seq 分析

以 TROzol 法提取地黄的总 RNA,用 Agilent 2100 Bioanalyzer 和 ABI Step One Plus Real-Time PCR System 进行质量和产量检测,合格的 RNA 用于建库测序。测序工作在华大基因进行,测序平台为 Ion Proton。以 FPKM 值表示基因的表达量,比较遮阴处理的地黄块根与未遮阴处理的地黄块根中基因的表达量,筛选出候选的差异表达基因。

测序获得 raw reads,通过对 raw reads 进行质控,过滤去杂后得到 clean reads,将获得的 clean reads 比对到参考地黄转录本数据库。通过统计比对到参考转录组的概率、clean reads 在参考序列上的分布概率等,判断比对结果是否通过第 2 次质控。之后进行基因定量分析、基于基因表达量的主成分分析、相关性分析、条件特异表达分析、差异基因筛选等,随后对筛选出的差异表达基因进行 GO 功能显著性富集分析、pathway 显著性富集分析、表达趋势分析等更深入的数据挖掘。

1.3 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

按 TaKaRa 提供的 TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit 试剂盒提取地黄块根和叶片的

总 RNA。用 Thermo Fisher Scientific 的核酸测定仪测定 RNA 的浓度和质量。采用 TaKaRa 反转录试剂盒 6210A 进行反转录, 用于 cDNA 第 1 链合成需要小于 2 μg 的总 RNA, 1 μL 的 oligo dT, 1 μL 的 dNTP Mixture, 加水补足体积到 10 μL , 反应程序为 65 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min, 取出在冰上迅速冷却。然后加入 0.5 μL 的 RNase, 1 μL 的 PrimeScript II RTase, 4 μL 的 5 $\times$ PrimeScript II Buffer, 加水补足体积到 20 μL 。反应程序为 42 $^{\circ}\text{C}$ 、60 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min。

所用 qRT-PCR 仪器为 Bio-Rad IQ5 (上海伯乐

公司)。根据候选基因的 CDS 序列设计特异性引物 (表 1)。使用的 qRT-PCR 分析试剂盒为 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus) (大连宝生物)。以 RgTIP41 为内参基因, 每个样本重复 3 次。PCR 扩增体系为 SYBR green·Taq II 12.5 μL , Primer·F+R 各 1 μL , cDNA 模板 2.0 μL , 加去离子水 8.5 μL 补足 25 μL 。反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 40 个循环, 设置在每个循环 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 时读取荧光值。根据 Bio-Rad iQ5 软件生成的 C_t 值, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算基因的相对表达量。

表 1 用于定量 PCR 的引物信息

Table 1 Primers used for qRT-PCR analysis

基因名	转录本名称	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')	扩增片段大小/bp
RgPAL	CL1389.Contig3	AGAGAGGAACCTGGGACGAA	CAAACCCTTGCTCAAAGCTG	96
RgTyDC	KU640395	ACCGTCTGCTTCTGCATATC	TACCCGATTCGTTAATCGCC	124
RgEXPA1	Unigene13756	TGTGGGAAAGAACTTCAGGG	CCTCTAACTTCTGCAAATCCCC	186
RgEXPA10	KF011918	ACTTATGGCGATTACGGAGG	TAACCTCGTAACACGACCCAC	189
RgEXPA8	Unigene10535	TACTAGCTACAACGTCGCAC	TAGAGCCACAGCCCTTAGAG	197
RgIAA1	Unigene16575	GTGGTTCTCAAGGGCTGAAG	CCATGGAACATCACCGACAA	128
RgERF	Unigene2558	TCCCTCACAAGATTGGCTTG	ATTGGCTCTCAACTTCCAGC	168
RgB-ARR	CL994.Contig4	CGTCAAGATGAAGTCAACGC	TTGGGGAGCTTCAAAAGTCG	138
RgA-ARR	CL3002.Contig2	TGCCTGGAATGACAGGATATG	AATCTTCGGCACCTTCTTCC	138
RgTCH4A	Unigene38832	GCCCTGACATTGTCCCTAGA	TGTCCAGCTCCTTGAGAAGA	155
RgCYCD3	CL2103.Contig2	AGCGTAGATTCCACTTGAGC	CGAGTCCGCATATGTTTTTCG	83
RgCesA	CL1073.Contig4	AGGCGAGCAGATCAAATCTA	AATCGCTGCTGCTAAGTTTCG	165
RgTIP41	KT306007	TGGCTCAGAGTTGATGGAGTG	TCTCCAGCAGCTTTCTCGGA	105

2 结果与分析

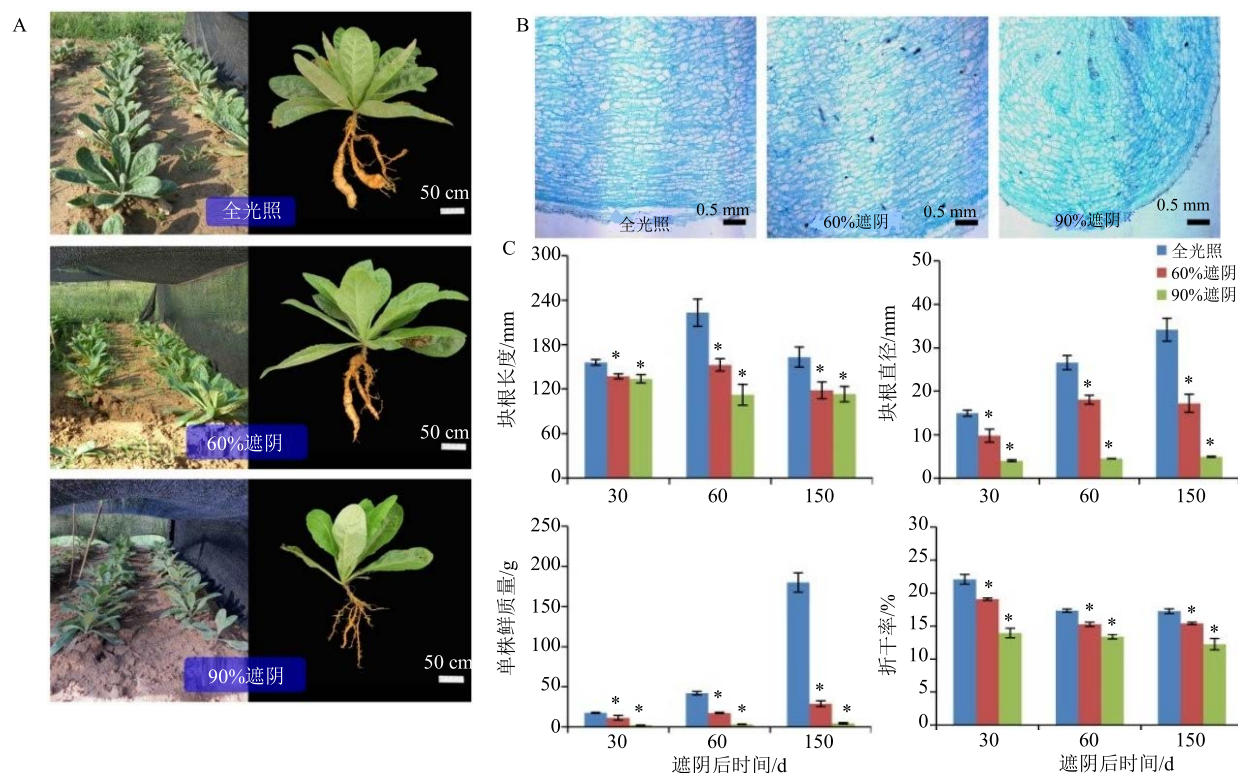
2.1 遮阴处理后地黄植株的形态特征

块根为地黄光合产物和次生代谢产物的储藏部位, 也是地黄的收获部位。遮阴实验结果 (图 1) 表明, 光照强度对块根的发育影响很大。遮阴后, 地黄块根膨大受阻, 90%遮阴的地黄块根几乎没有膨大 (图 1-A)。从块根的解剖结构来看, 遮阴后地黄块根的异次生生发育受阻, 薄壁细胞层数减少, 导管比例高, 特别是 90%遮阴处理的不定根与一般双子叶植物根的次生生发育类似 (图 1-B)。光照强度对地黄块根的发育影响很大, 遮阴 30 d 后, 块根长度、块根直径和单株块根产量均显著降低, 且 90%遮阴处理效果最显著, 遮阴 150 d 后块根直径和单株块根产量增加均不明显 (图 1-C)。另外, 遮阴对于地黄块根的含水量也有明显的影响, 在遮阴后 30、60、150 d, 块根折干率随着光照强度的降低而减小 (图 1-C)。光照强度对地黄单株块根数目

的影响较小, 不同光照处理的单株块根数遮阴 30 d 和 60 d 后均无显著差异, 遮阴 150 d 后 90%遮阴的块根数少于对照。

2.2 遮阴对地黄叶绿素含量及光合特性的影响

为了了解遮阴对地黄光合特性的影响, 分析了遮阴处理后地黄叶片中的叶绿素和类胡萝卜素的含量, 结果 (图 2-A) 发现随着遮阴程度的增加, 叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素含量逐渐降低, 90%遮阴处理与对照相比均达到显著水平, 说明遮阴后地黄的叶绿素含量降低。而 60%遮阴后块根中的类胡萝卜素含量显著升高, 而 90%遮阴处理与对照的含量无明显差异。分析遮阴后地黄叶片的光合参数, 结果 (图 2-B) 表明, 自然光强下, 地黄叶片的净光合速率 (P_n)、气孔导度 (G_s) 和蒸腾速率 (Tr) 最高, 遮阴后 P_n 、 G_s 和 Tr 显著降低, 且随着遮阴程度的增加 P_n 、 G_s 和 Tr 的降低程度逐渐增大, 而其胞间 CO_2 浓度 (C_i) 则变化不明显, 说明遮阴后



A-遮阴处理 60 d 后地黄的植株 B-遮阴处理 30 d 地黄块根的解剖结构 C-遮阴后地黄块根的表型性状, *与全光照比较差异显著 ($P < 0.05$), 下同
A-plant type of *R. glutinosa* at 60 days after shading treated B-anatomical characteristics of tuberous roots under full light, 60% shading and 90% shading conditions at 30 d after shading treated C-phenotype of *R. glutinosa* tuberous roots under different light conditions, * significant difference from full light ($P < 0.05$), same as below

图 1 不同遮阴条件下地黄块根的形态特征

Fig. 1 Morphological characterization of *R. glutinosa* tuberous roots under different shading conditions

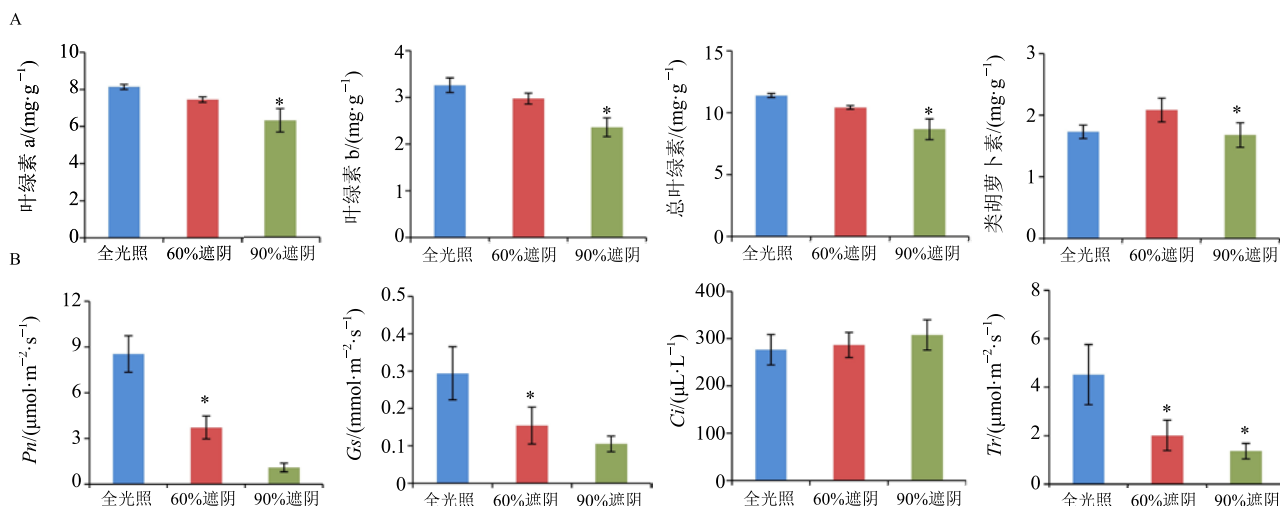


图 2 遮阴处理的地黄叶片叶绿素含量 (A) 及光合参数 (B)

Fig. 2 Chlorophyll content (A) and photosynthetic parameters (B) of *R. glutinosa* leaves after shading treatment

地黄叶片的光合能力下降, 积累的光合产物减少。

2.3 遮阴处理对地黄块根基因表达水平的影响

为了进一步了解遮阴条件下地黄块根内在的分子响应机制, 利用 RNA-Seq 对 90%遮阴处理的

地黄块根和未处理的地黄块根进行测序。结果在正常光照和 90%遮阴处理的地黄块根中分别获得了 11 357 661 和 9 133 620 个 clean reads (表 2)。用已有的地黄转录组为比对模板, 处理组和对照组分别

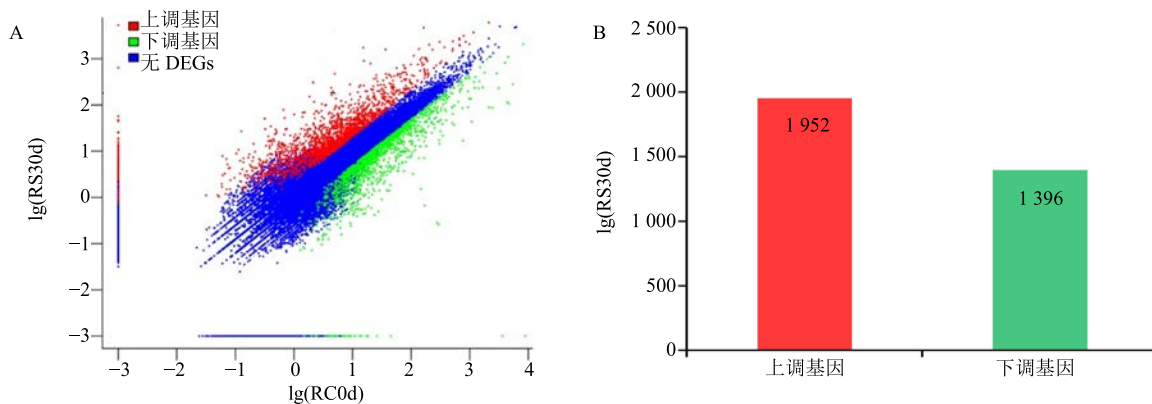
表 2 不同处理地黄块根的测序结果

Table 2 Statistics of Ion Proton reads and comparison to *R. glutinosa* tuberous root transcriptome

处理	总 clean reads/个	匹配转录组		特异匹配	
		reads/个	匹配率/%	reads/个	匹配率/%
全光照	11 357 661	11 222 827	98.81	8 189 575	72.11
90%遮阴	9 133 620	8 999 593	98.53	6 592 200	72.18

有 98.81% 和 98.53% 的 reads 能够匹配到参考基因上, 其中特异匹配的比例分别达到 72.11% 和 72.18%。2 个样品获得的 clean reads 能够匹配到参考基因的比例均大于 98%, 说明测序质量较高, 达到信息分析的要求。为了筛选地黄块根中响应遮阴

而差异表达的基因 (DEGs), 分析了 90% 遮阴处理的地黄块根与全光照的地黄块根转录组文库中基因的差异表达情况 (图 3-A), 结果共发现 3 348 个差异表达的基因, 其中遮阴后下调表达的基因有 1 396 个, 而上调表达的基因有 1 952 个 (图 3-B)。



A-遮阴后块根中的基因表达 B-遮阴后差异表达的基因数

A-gene expression level in shading tuberous root B-number of differentially expressed gene under shading condition

图 3 遮阴后地黄块根中的差异表达基因筛选

Fig. 3 Genes significantly differentially expressed in response to shading stress in *R. glutinosa* tuberous root

2.4 qRT-PCR 验证转录组数据的可靠性

从测序获得的差异基因中选取 10 个基因, 利用 qRT-PCR 分析验证转录组数据的有效性。挑选的差异基因转录本名称分别是 Unigene16394、CL379Contig1、Unigene13756、CL4373Contig2、Unigene10535、CL4160Contig2、CL721Contig1、CL994Contig4、CL3002Contig2、Unigene38832、CL4160Contig2、CL4599Contig2、CL3002Contig2、Unigene2558、Unigene21429、Unigene10535、Unigene13756、CL379Contig1, 以地黄 RgTIP41 为内参基因。结果 (图 4) 显示, qRT-PCR 与数字基因表达谱的结果上、下调表达趋势一致, 且两者的 Pearson 相关系数为 0.847 7, P 为 0.000 1, 达到极显著水平, 说明遮阴后获得差异表达基因的数据可靠。

2.5 地黄块根中响应遮阴处理的差异表达基因的 GO 分析和代谢通路富集分析

对筛选的 3 348 个差异表达的基因进行 GO 功能分类统计, 从宏观上认识地黄块根响应遮阴

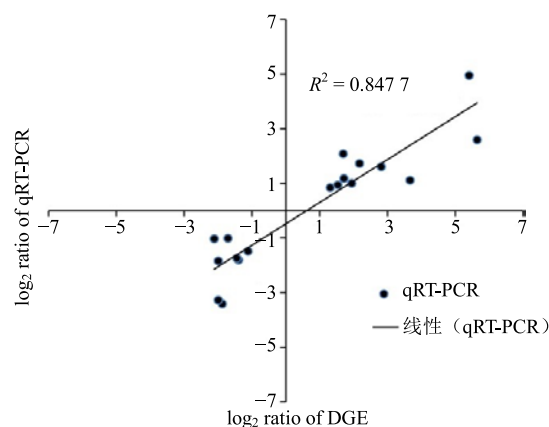


图 4 RNA-seq 数据与 qRT-PCR 结果的相关性分析

Fig. 4 Correlation analysis on results between RNA-seq and qRT-PCR

(RS30d) 特异基因的功能分布特征。其结果 (图 5) 显示, 以基因所处的细胞位置主要可分为 11 类, 其中, 细胞 (cell) 和细胞部分 (cell part) 这 2 类基因数量所占比例最大, 细胞器 (organelle) 类次

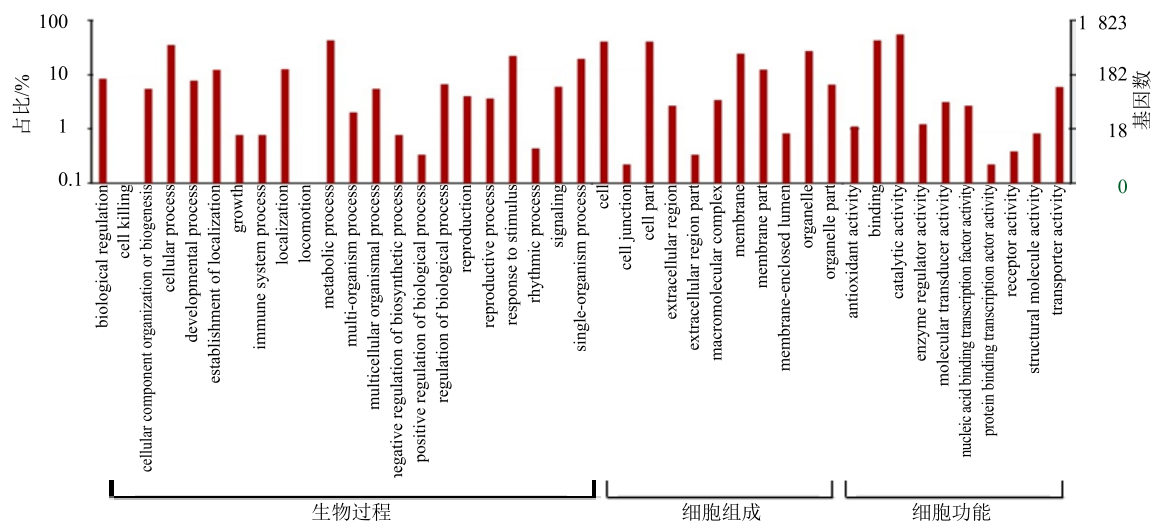


图 5 遮阴后地黄块根中差异表达的基因 GO 分类

Fig. 5 GO categories of shading stress-responsive DEGs in tuberous root of *R. glutinosa*

之，细胞连接部位（cell junction）和胞外区（extracellular region）的基因数量最少（均小于 0.2%）；按基因的分子功能可分为 10 类，其中，催化活性（catalytic activity）类和结合（binding）类基因数量最多（其百分比均大于 23%），其他 7 类中每类基因总数所占的百分比均小于 5%；按基因参与的生物过程主要分为 22 类，其中，新陈代谢过程（metabolic process）类和细胞过程（cellular process）基因总数最多，响应刺激（response to stimulus）和定位类（localization）次之（约 5%）、运动（locomotion）类和细胞杀伤（cell killing）类的基因最少，均只有 1 个基因。说明遮阴处理对地黄块根的影响涉及很多生理生化过程。通过对差异表达的基因进行 KEGG 代谢通路富集分析，把遮阴后地黄块根中差异表达的 1 668 个基因（53.4%）富集到 117 个代谢通路中，其中有 17 个代谢通路富集达到显著水平（ $P < 0.05$ ，图 6）。

最先得到富集的是植物激素信号传导通路（plant hormone signal transduction），参与该代谢通路的差异基因有 170 个，占有差异表达基因的 10.19%，说明遮阴后地黄的信号传导发生了变化，从而诱导了一系列的生长发育调控进程。176 个差异基因被富集到植物-病原菌互作通路（plant-pathogen interaction）中，说明遮阴后地黄块根中的免疫反应被激发了。苯乙醇苷生物合成通路（phenylpropanoid biosynthesis）第 5 个被富集出来，包含 71 个差异基因，暗示遮阴后地黄块根中苯乙醇苷类成分含量发生了变化。淀粉与蔗糖代谢通路

图 6 差异表达基因 KEGG 分析显著富集的前 20 个代谢通路
Fig. 6 Top 20 enriched KEGG pathways among annotated DEGs between shading and full light

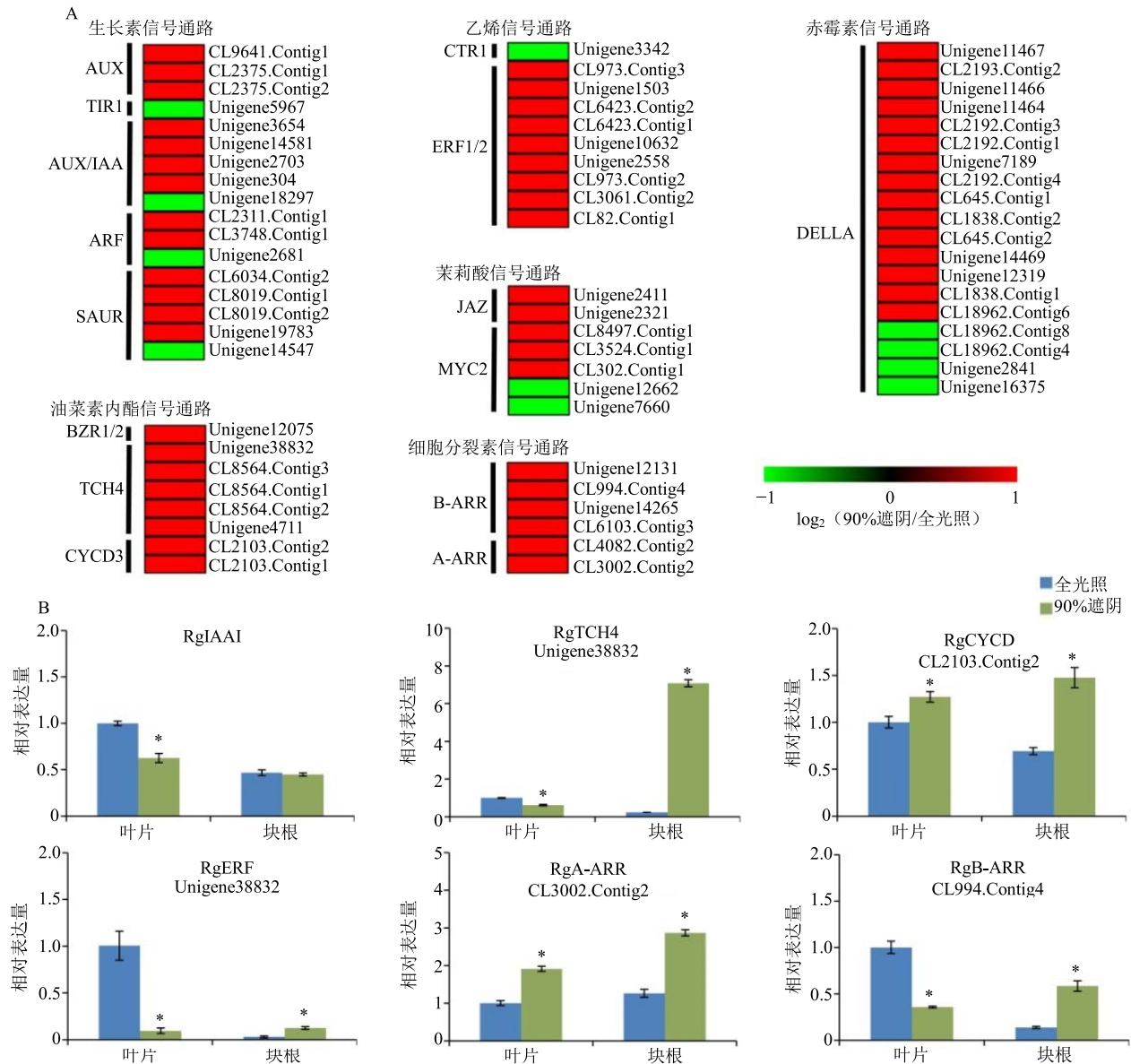
（starch and sucrose metabolism）也得到了显著富集，意味着遮阴影响了地黄的干物质积累和能量代谢。另外，苯乙醇苷生物合成（phenylpropanoid biosynthesis）、黄酮生物合成（flavonoid biosynthesis）、苯丙氨酸代谢（phenylalanine metabolism）、萜类物质生物合成通路也得到了显著的富集，说明遮阴广泛影响了地黄次生代谢产物的合成与积累。这些信息对于分析遮阴对地黄块根生

长发育、逆境胁迫和次生代谢产物积累的分子调控机制提供了必要的线索。

2.6 遮阴处理后地黄块根中激素信号通路基因的差异表达分析

为了阐明遮阴影响地黄块根生长发育的分子机制,筛选出 KEGG 富集的激素信号传导通路差异表达的基因,分析这些基因在遮阴后的表达特性,发现大多数差异表达的基因遮阴后表达量上调,仅

有少数基因表达量下调(图 7-A)。生长素信号通路中,3 个生长素运载基因(AUX1)全部上调表达,5 个生长素蛋白基因(AUX/IAA)、3 个生长素响应因子基因(ARF)、4 个生长素早期应答基因(SAUR)中均只有 1 个转录本下调表达,而对生长素运输有抑制作用的转运抑制应答因子 1 基因(TIR1)下调表达。油菜素内酯信号通路中,1 个芸薹素唑耐受因子 1/2 基因(BZR1/2)、5 个木葡聚糖内糖基转移



A-基于转录组数据的差异表达基因热图 B-基于 qRT-PCR 的基因相对表达量

A-heat map of differentially expressed genes involved in hormone signal transduction pathway B-relative expression levels of genes involved in hormone signal transduction pathway

图 7 遮阴处理后地黄激素信号通路基因的表达特性

Fig. 7 Expression patterns of differentially expressed genes involved in plant hormone signal transduction pathway in *R. glutinosa* tuberous root and leaf after treated by shading

酶基因 (TCH4) 和 2 个 D 型细胞周期蛋白 3 基因 (CYCD3) 均上调表达。乙烯信号通路中, 1 个组成型三重反应基因 (CTR1) 基因下调表达, 9 个乙烯响应因子 1/2 基因 (ERF1/2) 均上调表达。茉莉酸信号通路中, 2 个茉莉酸负调控因子基因 (JAZ) 基因均上调表达, 5 个含 bHLH 结构域的 MYC2 转录因子基因中 3 个上调表达, 2 个下调表达。细胞分裂素信号通路中, 4 个 B 类 ARR 基因 (B-ARR) 和 2 个 A 类 ARR 基因 (A-ARR) 均上调表达。赤霉素信号通路中, 有 19 个差异表达的 DELLA 基因转录本, 其中 15 个转录本上调表达, 4 个转录本下调表达。

应用 qRT-PCR 分析了 6 个信号通路基因在地黄叶片和块根中的表达量, 结果 (图 7-B) 激素信号基因在叶片和块根中呈现不同的表达模式。响应地黄连作的 AUX/IAA 基因 RgIAA1^[23] 在遮阴的地黄叶片中显著下调表达, 在块根中表达量下调不明显。油菜素内酯通路的 TCH4 基因 Unigene38832、乙烯信号通路的 ERF 基因 Unigene38832 和细胞分裂素信号通路的 B-ARR 基因 CL994.Contig4 均是在地黄叶片中下调表达, 而在块根中上调表达。油菜素内酯信号通路的 CYCD3 基因 CL2103.Contig2 和细胞分裂素信号通路的 A-ARR 基因 CL3002.Contig2 在地黄叶片和块根中均上调表达。激素信号基因的差异表达分析为遮阴后地黄块根膨大受阻机制研究提供了重要的信息。

2.7 遮阴处理后地黄块根中膨大相关基因的差异表达分析

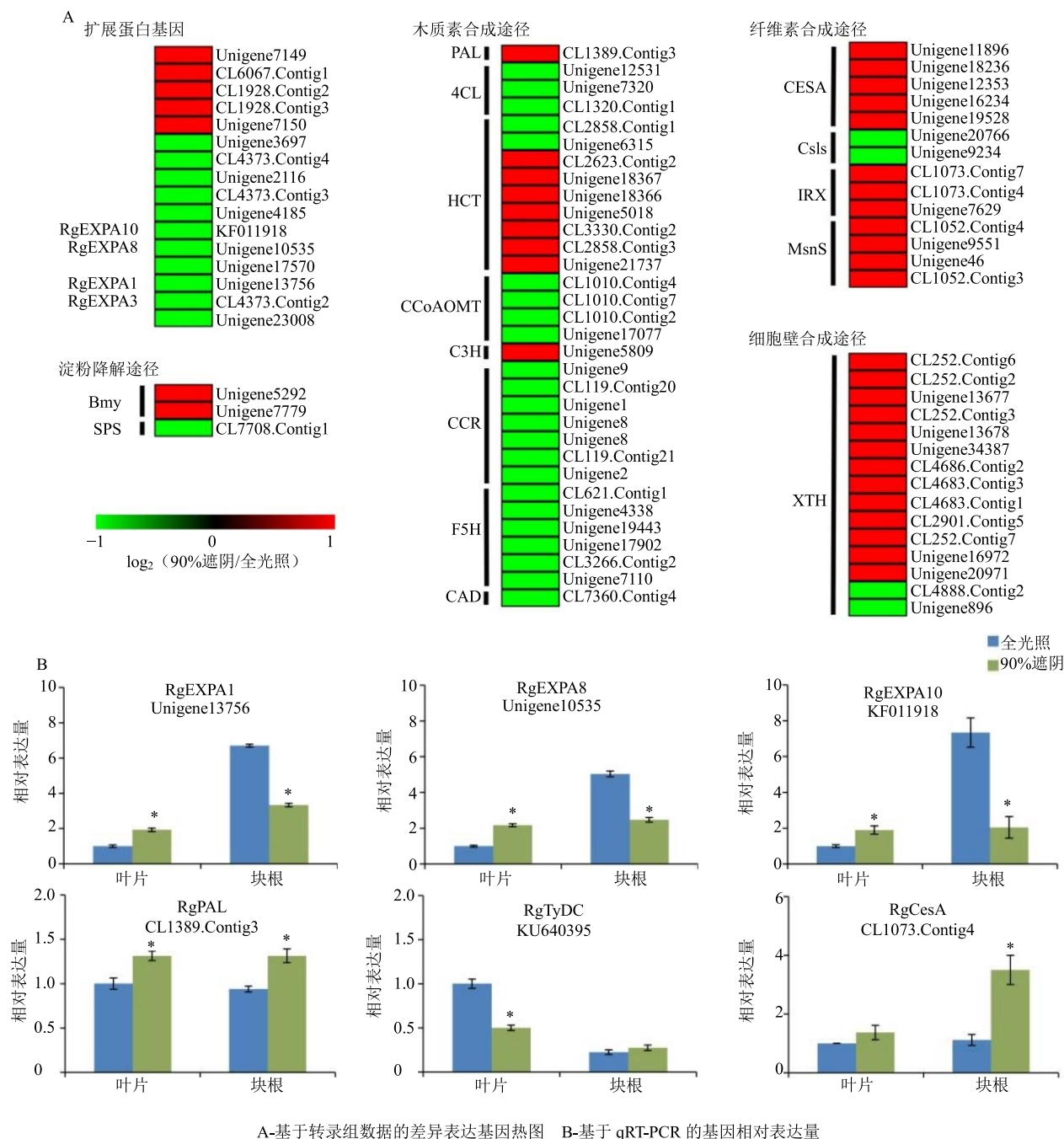
进一步分析了与细胞增殖、蔗糖与淀粉代谢、木质素合成、纤维素合成及细胞壁形成有关的基因在遮阴后的表达变化, 结果 (图 8-A) 发现遮阴后 16 个扩展蛋白基因在地黄块根中差异表达, 其中 11 个基因下调表达, 仅有 5 个上调表达。与淀粉降解有关的 2 个 β -淀粉酶基因 (Bmy) 基因均上调表达, 而蔗糖磷酸合成酶基因 (SPS) 下调表达, 说明淀粉降解加快, 蔗糖合成减少。参与木质素合成的 8 个催化酶的 32 个编码基因呈差异表达, 其中 1 个苯丙氨酸解氨酶基因 (PAL)、7 个乙酰转移酶基因 (HCT) 和 1 个香豆酸-3-羟基化酶基因 (C3H) 上调表达, 其余基因均下调表达, 包括木质素合成关键的限速酶肉桂酰辅酶 A 还原酶基因 (CCR)、阿魏酸-5-羟基化酶基因 (F5H) 和乙醇脱氢酶基因 (CAD) 全部都下调表达, 可能导致木质素合成的

减少。纤维素合成途径有 14 个基因差异表达, 除 2 个类纤维素合酶基因 (Csls) 下调表达外, 5 个纤维素合酶基因 (CesA)、3 个 β -1,4-D-木聚糖合酶基因 (IRX) 和 4 个 β 甘露糖合酶基因 (ManS) 均上调表达, 可能引起纤维素的合成增加。参与细胞壁形成的木葡聚糖内切葡聚糖酶/水解酶基因 (XTH) 有 13 个上调表达, 仅有 2 个下调表达, 可能细胞壁的合成能力增加。

以 qRT-PCR 分析了 3 个在遮阴的地黄块根中下调表达的扩展蛋白基因 (图 8-B), 发现遮阴后它们在地黄块根中的表达量下降超过 1 倍, 而在叶片中却表达量上升, 这与遮阴对块根发育的影响更大是一致的。遮阴后, RgPAL 基因 CL1389.Contig3 在块根和叶片中的表达量均显著增加, 这与 RNA-seq 分析结果一致。1 个苯乙醇苷生物合成途径的关键酶基因 RgTyDC (KU640395) 在叶片中显著下调, 在块根中略有上调。遮阴后, 纤维素合酶基因 CesA (CL1073.Contig4) 在地黄块根和叶片中均显著上调表达, 与 RNA-seq 分析结果一致。RNA-seq 与 qRT-PCR 分析结果为阐明遮阴对地黄块根膨大与次生代谢产物积累的影响机制提供了重要的实验依据。

3 讨论

光是植物进行光合作用的基础, 但光照太强或太弱都会影响植物光合效率, 很多植物在白天光照最强时存在“午休”现象, 即光照最强的中午, 由于气孔的关闭, 使植物体内获得的 CO_2 减少, 影响了暗反应过程中 CO_2 的固定, 光合作用减弱, 净光合速率降低。当光照强度为自然光照的 40% 和 60% 时, 树莓的最大净光合速率均显著降低^[24]。耐阴植物三七在透光率为 4.65%~5.10% 的荫棚下, 随着透光率的减小, 三七净光合速率随之增大^[25]。地黄为喜光植物, 需要在良好光照条件下才能正常生长。薛建平等^[26]研究表明, 地黄净光合速率日变化呈“双峰型”曲线, 且地黄净光合速率与光照强度呈极显著正相关。本研究发现 60% 和 90% 遮阴下, 地黄的净光合速率、气孔导度和蒸腾速率均显著降低 (图 2)。在地黄的生长期遮阴, 块根膨大受阻, 块根变细, 90% 遮阴的地黄块根几乎没有膨大, 地黄的产量严重降低 (图 1)。这些结果进一步验证了地黄生长期需要充足的光照, 光照不足会影响地黄的块根膨大, 农业生产上当地黄与高秆作物间作时, 可能会影响地黄的产量。



A-基于转录组数据的差异表达基因热图 B-基于 qRT-PCR 的基因相对表达量

A-Heat map of DGEs related to the expansion of tuberous root B-Relative expression levels of differentially expressed genes in tuberous root and leaf after shading treated

图 8 遮阴处理后地黄块根发育及次生代谢产物积累相关差异基因的表达模式

Fig. 8 Expression patterns of differentially expressed genes related to development of *R. glutinosa* tuberous root and its secondary metabolites accumulation after treated with shading

地黄块根膨大是次生形成层持续快速分裂，以及副形成层的形成和分裂的结果^[27]。激素是马铃薯块根发育过程中的重要调节因子^[28]，在地黄块根发育过程中也发挥重要作用^[29]。为了分析地黄块根膨大受阻的分子机制，研究了遮阴后的地黄块根转录组，发现植物激素信号传导通路在 KEGG 分析中最

先得到富集(图 6)，占有差异表达基因的 10.19%，说明遮阴后地黄的激素信号传导发生了变化，调控了一系列的生长发育进程。筛选到一些与未遮阴对照差异表达的基因，可能是引起地黄膨大受阻的关键基因。在分析的 67 个激素信号通路基因中，包括生长素信号通路、油菜素内酯信号通路、乙烯信号通

路、赤霉素信号通路、茉莉酸信号通路和细胞分裂素信号通路的大多数基因在遮阴后均上调表达（图 7），说明遮阴后地黄激素信号通路的基因通过提高表达以应对光合产物的减少。TCH4 基因编码木葡聚糖内糖基转移酶，受生成素和油菜素内酯调控^[30]，能够促进细胞壁的松弛，遮阴后地黄 TCH4 的 5 个转录本全部上调表达而在叶片中却下调表达，说明遮阴后通过提高细胞分裂以加速地黄块根生长。乙烯响应因子 EFR1/2 受多种防御因素诱导，可能与植物的木质化程度有关^[31]，遮阴后地黄块根中 ERF1/2 的 9 个转录本全部上调表达，说明遮阴后块根通过提高木质化程度以应对光合产物积累的不足。通过分析遮阴后与植物器官发育相关的扩展蛋白基因、木质素形成基因、纤维素合成基因等，发现遮阴后多数扩展蛋白编码的基因下调表达（图 8），与遮阴后地黄块根膨大受阻呈正相关。 β 淀粉酶基因参与淀粉降解，与植物块根发育有关^[32]，遮阴后地黄块根中 2 个 Bmy 基因均上调表达，说明块根通过加速淀粉降解以补充块根膨大所需的营养。木质素合成有关的多数基因均下调表达，这与遮阴后木质化程度加深并不一致，具体原因有待进一步研究。与木质素合成基因不同，遮阴后块根中纤维素和细胞壁形成有关的大多数基因均上调表达。qRT-PCR 分析结果表明，差异表达基因在叶片中和块根中有不同的调控效应，可能与遮阴对地黄叶片发育影响较小而块根受影响较大有关。

研究人员近年来已经开始关注光照强度对药用植物次生代谢产物积累的影响。遮阴后青蒿 *Artemisiae annie* 花蕾中青蒿素的含量降低，总黄酮含

量增加^[17]。40%遮光和 70%遮光处理下紫甘薯块根中的花青素含量均明显降低，尤其在遮阴中后期差异更加显著^[33]。对曼陀罗 *Datura stramonium* L. 和紫花曼陀罗 *Datura stramonium* var. *tatual* L. 的分析结果表明，花色苷、类黄酮及总酚含量均与光照强度呈正相关^[9]。随着遮阴程度的升高和遮阴时间的延长，滇山茶 *Camellia reticulata* Lindl. 花瓣中 13 种花青素苷的含量均呈现先升高后下降的变化趋势^[34]。30%和 50% 2 种遮阴处理下珠子参 *Panacis japonicas* C. A. Mey. var. *major* (Burk.) C. Y. Wu et K. M. Feng 叶和根茎中的总皂苷含量均高于未遮阴对照^[35]。组织培养条件下，铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 类原球茎多糖、和生物碱分别在光照强度 2 000 lx 和 500 lx 下培养 30 d 含量最高^[36]。课题组发现遮阴后地黄叶片中的毛蕊花糖苷含量降低，块根中毛蕊花糖苷含量升高^[22]。本研究的定量分析结果显示，遮阴后 RgTyDC 基因表达量在叶片中下降，在块根中略有升高（图 8），这与遮阴后地黄叶片的毛蕊花糖苷含量降低、块根中毛蕊花糖苷含量升高的趋势是一致的^[22]。说明遮阴是通过调控催化酶基因表达量的变化影响次生代谢产物的积累。

4 结论

根据遮阴后地黄植株的表型及块根转录组的分析结果，可初步推测出遮阴抑制地黄块根膨大的分子机制（图 9）：遮阴导致地黄光合能力下降，光合产物积累减少，运往地下部分的光合产物不足以维持地黄块根的正常发育，导致激素信号通路基因表达发生了变化，扩展蛋白基因表达量下降，块根

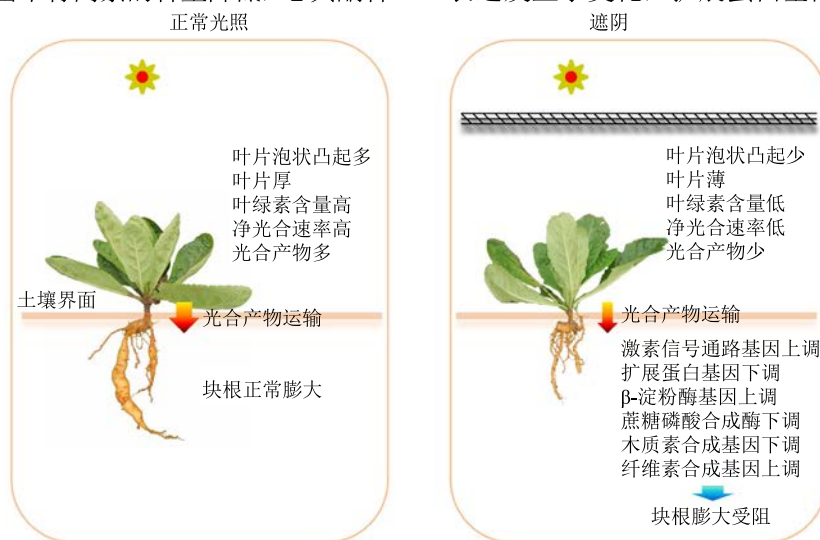


图 9 遮阴抑制地黄块根膨大的机制

Fig. 9 Mechanism of shading on tuberous root thickening of *R. glutinosa*

中淀粉降解速率加快,细胞壁合成能力提高,地黄块根膨大变慢。

参考文献

- [1] 张艳艳, 张嘉翔, 袁晓婷, 等. 不同光照强度对二苞黄精植株生长发育的影响 [J]. 北方园艺, 2013(17): 61-63.
- [2] 刘 从, 田 甜, 李 珊, 等. 中国木本植物幼苗生长对光照强度的响应 [J]. 生态学报, 2018, 38(2): 518-527.
- [3] 陈玉峰, 黄旭峰, 古 锐, 等. 不同光照强度下红毛五加光合及生理特性研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(5): 926-933.
- [4] 赵文吉, 张德林, 何正军, 等. 独一味幼苗生理特性和次生代谢产物对遮阴的响应 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(15): 72-76.
- [5] 刘 婧, 柳艳梅, Takano J, 等. 光敏色素影响赤霉素调控的水稻幼苗光形态建成特征 [J]. 科学通报, 2010, 55(24): 2384-2390.
- [6] Kim B C, Tennessen D J, Last R L. UV-B-induced photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2010, 15(5): 667-674.
- [7] Liang T, Mei S, Shi C, *et al.* UVR8 interacts with BES1 and BIM1 to regulate transcription and photomorphogenesis in *Arabidopsis* [J]. *Dev Cell*, 2018, 44(4): 279-289.
- [8] 武高林, 陈 敏, 杜国祯. 三种高寒植物幼苗生物量分配及性状特征对光照和养分的响应 [J]. 生态学报, 2010, 30(1): 60-66.
- [9] 毛立彦, 慕小倩, 董改改, 等. 光照强度对曼陀罗和紫花曼陀罗生长发育的影响 [J]. 植物生态学报, 2012, 36(3): 243-252.
- [10] 魏永赞, 李伟才, 董 晨, 等. 光照对植物花色苷生物合成的调控及机制 [J]. 植物生理学报, 2017, 53(9): 1577-1585.
- [11] Lee H J, Park Y J, Ha J H, *et al.* Multiple routes of light signaling during root photomorphogenesis [J]. *Trends Plant Sci*, 2017, 22(9): 370-379.
- [12] Lian H L, Xu P B, He S B, *et al.* Photoexcited CRYPTOCHROME 1 interacts directly with G-protein β Subunit AGB1 to regulate the DNA-binding activity of HY5 and photomorphogenesis in *Arabidopsis* [J]. *Mol Plant*, 2018, 11(10): 1248-1263.
- [13] Dai Y J, Shen Z G, Ying L, *et al.* Effects of shade treatments on the photosynthetic capacity, chlorophyll fluorescence, and chlorophyll content of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg [J]. *Envir Exper Bot*, 2009, 65(2): 177-182.
- [14] 王 蕊, 孙 备, 李建东, 等. 不同光强对入侵种三裂叶豚草表型可塑性的影响 [J]. 应用生态学报, 2012, 23(7): 1797-1802.
- [15] 杜彦修, 季 新, 张 静, 等. 弱光对水稻生长发育影响研究进展 [J]. 中国生态农业学报, 2013, 21(11): 1307-1317.
- [16] 崔海岩, 靳立斌, 李 波, 等. 遮阴对夏玉米干物质积累及养分吸收的影响 [J]. 应用生态学报, 2013, 24(11): 3099-3105.
- [17] 曾祥琼, 江 玲, 何荣会, 等. 遮阴对青蒿花蕾青蒿素含量的影响 [J]. 中国农学通报, 2011, 29(2): 155-158.
- [18] 褚晨亮, 曾令杰. 遮阴处理对穿心莲生长和品质的影响 [J]. 广东药学院学报, 2013, 29(1): 39-42.
- [19] 李红伟, 孟祥乐. 地黄化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(2): 218-228.
- [20] 王丰青, 谢彩侠, 孙瑞斌, 等. 地黄种质创新与品种选育研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(21): 1-11.
- [21] Li M, Yang Y, Li X, *et al.* Analysis of integrated multiple 'omics' datasets reveals the mechanisms of initiation and determination in the formation of tuberous roots in *Rehmannia glutinosa* [J]. *J Exper Bot*, 2015, 66(19): 5837-5851.
- [22] 王丰青, 王丽娜, 智惊宇, 等. 不同品种地黄中毛蕊花糖苷的动态积累规律变化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(24): 78-83.
- [23] 王丰青, 田云鹤, 李明杰, 等. 地黄 Aux/IAA 家族基因 RgIAA1 的克隆和表达分析 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(23): 4033-4039.
- [24] 王晓冬, 贺国强, 赵利群, 等. 遮阴对树莓光合特性和果实性状的影响 [J]. 植物研究, 2014, 34(5): 599-603.
- [25] 左端阳, 匡双便, 张广辉, 等. 三七 (*Panax notoginseng*) 对不同光照强度的生理生态适应性研究 [J]. 云南农业大学学报: 自然科学版, 2014, 29(4): 521-527.
- [26] 薛建平, 王 兴, 张爱民, 等. 地黄光合特性研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(6): 778-782.
- [27] 王鹏飞, 李鑫宇, 李明杰, 等. 地黄块根膨大发生和驱动的组织观察及激素相关基因的调控分析 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(17): 3245-3253.
- [28] 全 锋, 张爱霞, 曹先维. 植物激素在马铃薯块茎形成发育过程中的作用 [J]. 中国马铃薯, 2002(1): 29-32.
- [29] 薛建平, 葛德燕, 张爱民, 等. 试管地黄的不定根膨大过程中 4 种内源激素的消长 [J]. 作物学报, 2004, 30(10): 1056-1059.
- [30] Xu W, Purugganan M M, Polisensky D H, *et al.* *Arabidopsis* TCH4, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase [J]. *Plant Cell*, 1995, 7(10): 1555-1567.
- [31] 曹国丽, 张永丰, 孙亚卿, 等. ERF 转录因子家族在甜菜块根发育中的功能分析 [J]. 植物生理学报, 2018, 54(5): 745-754.
- [32] Wang H, Yang J, Min Z, *et al.* Altered phenylpropanoid metabolism in the maize lc-expressed sweet potato (*Ipomoea batatas*) affects storage root development [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 18645-18659.
- [33] 王庆美, 侯夫云, 汪宝卿, 等. 遮阴处理对紫甘薯块根品质的影响 [J]. 中国农业科学, 2011, 44(1): 192-200.
- [34] 希从芳, 郑 丽, 字淑慧, 等. 不同遮阴处理对滇山茶花瓣花青素苷构成的影响 [J]. 园艺学报, 2013, 40(10): 2006-2014.
- [35] 黄文静, 孙晓春, 李 铂, 等. 遮阴对珠子参皂苷合成关键酶基因表达和皂苷积累的影响 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(19): 3855-3861.
- [36] 徐步青, 崔永一, 郭 岑, 等. 不同光照强度和培养时间下铁皮石斛类原球茎生物量、多糖和生物碱的动态变化 [J]. 中草药, 2012, 43(2): 355-359.