

## 地黄分子鉴定及功能基因研究进展

詹忠根

浙江经贸职业技术学院 应用工程系, 浙江 杭州 310018

**摘要:** 地黄是我国常见的大宗药材之一, 药用历史悠久。近年来, 随着分子生物学技术的进步, 尤其是高通量测序技术的出现, 不仅为地黄的快速鉴定提供了新方法, 也较全面地揭示了其种群的遗传多样性和亲缘关系, 更为地黄的活性成分合成代谢调控、块根发育、抗逆响应和连作障碍等机制的研究奠定了分子基础。从系统学研究、分子鉴定、功能基因等方面对近年来地黄分子生物学的研究进展进行了综述, 并提出 3 点研究展望, 以期为进一步深入开展地黄的分子研究提供参考。

**关键词:** 地黄; 分子系统学; 分子鉴定; 功能基因; 连作障碍

**中图分类号:** R282.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)22-5611-10

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.22.032

## Advances in molecular identification and functional genes of *Rehmannia glutinosa*

ZHAN Zhong-gen

Applied Engineering Department, Zhejiang Institute of Economics and Trade, Hangzhou 310018, China

**Abstract:** *Rehmannia glutinosa* is one of the most common bulk medicinal materials in China and it has a long history of medicinal use. In recent years, with the development of molecular biology, especially for the emergence of high-throughput sequencing technology, it not only provides new ways to identify *R. glutinosa* quickly, and reveal the genetic diversity and relationship of *R. glutinosa*, but also lays the vital foundation for explaining the mechanism on metabolism, root tuber growth, stress response and continuous cropping obstacles of *R. glutinosa*. The present paper reviews the recent study progress in molecular biology research of *R. glutinosa* from molecular systematics, molecular identification and functional genes, and puts forward three research prospects in order to provide a reference for further study on molecular biology of *R. glutinosa*.

**Key words:** *Rehmannia glutinosa* Libosch.; molecular systematics; molecular identification; functional genes; continuous cropping obstacles

地黄属 *Rehmannia* Libosch. ex Fisch. et Mey. 隶属于列当科 (Orobanchaceae), 为中国特有属。据《中国植物志》记载该属有 6 个原生种, 分布较为广泛, 不同的生境导致该属植物外观形态差异较大, 经常造成分类学上的争议, 如化学成分及分子证据显示高地黄 *R. elata* N. E. Brown 和裂叶地黄 *R. piasezkii* Maxim. 实为同种植物, 茄叶地黄 *R. solanifolia* Tsoong et Chin 与地黄 *R. glutinosa* (Gaertn.) Libosch. ex Fisch. et Mey. 也应予以归并<sup>[1-2]</sup>。地黄属中湖北地黄 *R. henryi* N. E. Brown 会被当地药农用作中药地黄的替代品。地黄是药用地黄的唯一基原植物, 其块根具有广泛的药理活性, 如滋阴健肾、清热解毒、补血、防癌、抗癌、增强免疫力、延缓衰老、增强

造血能力和降低血糖等<sup>[3-4]</sup>, 具有很高的药用价值。其药用成分主要是环烯醚萜类化合物, 目前已从地黄中分离鉴定出 70 余种, 包括梓醇 (catalpol)、益母草苷、桃叶珊瑚苷、二氢梓醇、地黄苷 A、地黄苷 D 等, 其中梓醇是地黄的标志性成分, 在《中国药典》2015 年版中被称为地黄的质量评价指标, 其对神经退行性疾病如阿尔茨海默病和帕金森病有显著疗效。研究表明, 产地、品种等差异对地黄品质影响较大, 在地黄主产区, 以河南的怀地黄最为著名, 质量最优<sup>[5]</sup>, 但地黄品种众多, 优劣混杂, 品种间形态相近, 采用传统的形态特征和系谱来源进行鉴定较为困难。此外, 地黄作为是我国最为常见的大宗药材之一, 提高其药用成分的积累和

收稿日期: 2019-08-15

作者简介: 詹忠根 (1971—), 男, 浙江江山人, 教授, 硕士, 研究方向为药用植物生物技术。Tel: (0571)86929748 E-mail: zhgz9321@163.com

克服连作障碍等是提高其经济价值亟需面对的重要课题。鉴于上述因素,近年来研究者在地黄的系统学研究、分子鉴定及功能基因等方面开展了大量研究,并取得了长足进展,不仅为地黄的快速鉴定提供了新方法,也较全面地揭示了其种群的遗传多样性和亲缘关系,更为地黄的活性成分合成代谢调控、块根发育、抗逆响应和连作障碍等机制的研究奠定了分子基础。为此,本文尝试对此进行综述,以期为进一步深入开展地黄的分子研究提供参考。

## 1 地黄分子系统学研究

### 1.1 地黄属分类地位修订

由于潜在的杂交和多倍化现象,地黄属的系统位置存在争议。经典分类学将地黄属归于玄参科(Scrophulariaceae),但基于地黄属和崖白菜属植物的叶绿体部分片段(*rbcL*、*ndhF*、*rps16*、*trnL-F*)和核基因组 ITS 序列的比较分析,研究者认为应将地黄属划分为列当科的第 2 个非寄生分支<sup>[6]</sup>,目前该建议得到被子植物分类系统(APG)的认可和采纳,在 APG IV 中已将地黄属归在了列当科。这一更改的正确性也在随后的研究中得到佐证,如 6 种地黄属植物的叶绿体基因组全序列、蛋白编码序列、LSC 和 SSC 4 个数据集对唇形目 23 个物种的系统发育重建显示地黄属是一个单系类群,且与列当科的其他物种构成姐妹类群<sup>[7-8]</sup>。从而,地黄属的系统分类地位在基因组水平上得到修订。

### 1.2 地黄属内种间关系分析

除系统分类外,地黄属的属内种间关系也得到明确。基于形态学、花粉、同工酶、化学组成和叶绿体基因 *trnL-F*、*rps16* 和核基因 ITS 基因等分析,认为裂叶地黄与高地黄应归为同一物种<sup>[9-14]</sup>,天目地黄 *R. chingii* Li 与湖北地黄、地黄和茄叶地黄分别组成姐妹类群<sup>[15]</sup>。其中地黄和茄叶地黄的染色体倍数相同、叶绿体和核基因同为单倍型,被认为是同源植物,在该属中进化水平最高<sup>[10-11]</sup>。然而不同的分子标记得到的物种关系及分化次序并不一致,甚至互相矛盾,核基因组数据显示裂叶地黄在本属中最早分化<sup>[11]</sup>,而叶绿体数据则显示天目地黄才是最原始分支<sup>[6]</sup>。为此,刘占林等<sup>[16]</sup>基于叶绿体与核基因片段,同时采用最大简约法(MP)、最大似然法(ML)和贝叶斯法对地黄属进行系统发育重建,结果支持天目地黄是原始类群的观点,并认为地黄属物种的形成与中新世末期的地理气候条件关系密切,在经历了 3 次扩张与 2 次隔离事件后形成地黄

属植物的差异性分布态势。

### 1.3 地黄种内遗传多样性探讨

地黄品种的遗传多样性和亲缘关系研究始于 1997 年,Choi 等<sup>[17]</sup>将随机扩增多态性 DNA(RAPD)标记技术用于评价地黄愈伤组织再生植株的多样性;Hatano 等<sup>[18]</sup>则将其用于诊断茎尖繁殖的地黄品种和 F1 杂种。随后,陈京荔等<sup>[19]</sup>、周延清等<sup>[20]</sup>、吴志刚等<sup>[21]</sup>、王艳等<sup>[22]</sup>、石海霞等<sup>[23-24]</sup>相继利用 RAPD、简单重复序列区间(ISSR)、相关序列扩增多态性(SRAP)、目标起始密码子多态性(SCoT)标记技术分析地黄种内变异及亲缘关系。然而,上述分子标记由于自身的局限性,不能有效区分杂合体,而且根据其他植物分子标记位点的通用引物来进行地黄种质资源的研究,特异性较差。为此,郭冠瑛<sup>[25]</sup>基于地黄转录组数据,开发出上千个表达序列标签-微卫星(EST-SSR)位点以提高地黄资源鉴定的精确度和分辨率。地黄种内遗传多样性的研究表明,野生地黄的遗传关系与地理位置紧密相关,同一地域的野生地黄亲缘关系较近<sup>[23]</sup>。营养繁殖、人工栽培虽在一定程度上降低了地黄品质退化速度,但也导致主栽品种遗传背景单一,居群内部遗传多样性不足、居群间基因交流有限、遗传分化显著等不良后果<sup>[22,24,26]</sup>。因此,在地黄良种培育中,应注重引入比栽培品种遗传差异更丰富的野生资源优异基因<sup>[22-23]</sup>,同时应注意同一品种的繁殖代数,避免因遗传突变而引发品质退化。

### 2 地黄的分子鉴定

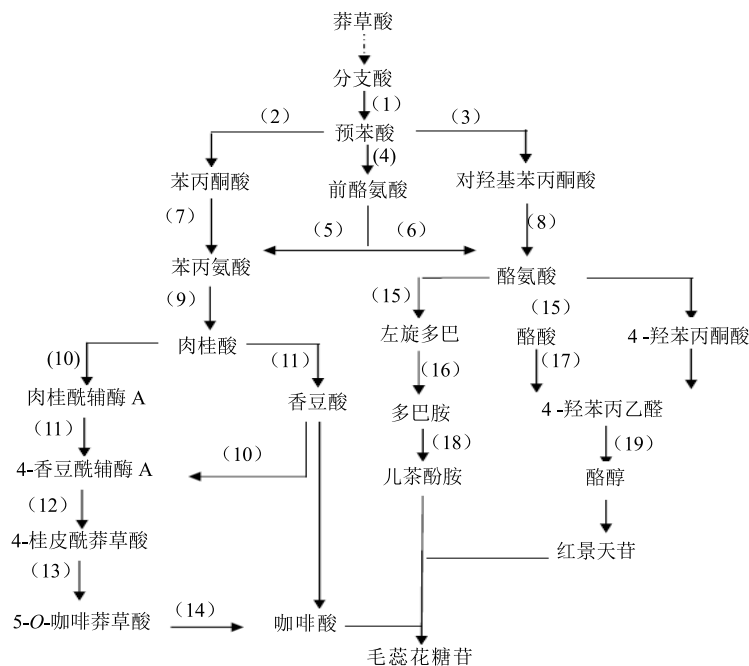
地黄是高度杂合体,为保证品质稳定,生产上采用块根繁殖,但品种间的表型差异并不明显,药农在选种、育种中种源混杂难以避免,“同名异物”和“同物异名”的现象比较严重,DNA 分子标记技术为地黄种质鉴定提供了科学合理、快速简便的方法。目前用于地黄分子鉴定的标记主要有 2 类:一类是基于聚合酶链式反应(PCR)的分子标记。如 Kim 等<sup>[3]</sup>利用 RAPD 技术筛选出用于鉴别中、韩地黄的特殊引物。周鹏<sup>[27]</sup>以 RAPD 技术为基础,成功将 S135 引物转化为序列特征扩增区(SCAR)标记,获得 1 条稳定扩增的特异片段用于地黄的快速鉴定。周延清等<sup>[28]</sup>筛选出 1 对用于鉴别怀区 10 个品种地黄的 ISSR 引物。谷凤平<sup>[29]</sup>进行了地黄 SRAP 反应条件的优化并构建了怀地黄 23 个品种的 DNA 指纹图谱,筛选出适合 22 个怀地黄品种 SRAP 分析的引物 12 对。最近,杨珂等<sup>[30]</sup>通过优化 SCoT-PCR



转移酶 (AACT) 和羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (HMGR) 基因的表达与环烯醚萜的合成无明显对应关系; MEP 途径的 1-脱氧-*D*-木酮糖-5-磷酸合酶 (DXS)、5-磷酸脱氧木酮糖还原异构酶 (DXR) 和 1-羟基 2-甲基-*E*-丁烯基 4-焦磷酸还原酶 (HDR) 基因主要在叶片中表达, 其中 DXS 基因属于 DXSII 型和 DXSIII 型, DXR3 基因的表达量与叶片中梓醇、总环烯醚萜苷含量显著正相关; 认为牻牛儿苗焦磷酸合酶 (GPPS) 可能为异源二聚体, 是调控地黄中梓醇合成的关键酶。朱昀昊等<sup>[35]</sup>从转录组数据中找到编码萜类骨架合成的 unigenes 81 条, 参与细胞色素 P450 酶 (CYP450) 介导的地黄环烯醚萜合成后修饰的 unigenes 226 条, 以及糖基转移酶相关的 unigenes 102 条。上述基因中, RgDXR、RgGGPPS1、RgGGPPS2 等基因序列已被克隆。RgDXR 基因 cDNA 全长为 1 425 bp, 编码 474 个氨基酸, 含 4 个典型功能结构域, 即 1 个 NAD (P) 结合结构域、1 个 DXR 蛋白 N 端结构和 2 个 DXR 蛋

白 C 端结构域<sup>[38-39]</sup>。RgGGPPS1 基因 cDNA 全长 987 bp, 编码 328 个氨基酸, RgGGPPS2 基因 cDNA 全长 867 bp, 编码 289 个氨基酸, 两者均含 2 个富含天冬氨酸的保守基序。其中 GGPPS2 与梓醇的合成有关, GGPPS1、G10H 与总环烯醚萜苷的合成有关<sup>[40]</sup>。

苯乙醇苷类化合物毛蕊花糖苷是地黄质量评价的另一指标性成分,其生物合成起始于苯丙氨酸和酪氨酸,酪氨酸通过酪胺、多巴胺合成毛蕊花糖苷的羟基酪醇部分,苯丙氨酸通过肉桂酸途径合成咖啡酰基团,其中转苯丙氨酸酶(PAL)基因和酪氨酸脱羧酶基因(TyDC)是毛蕊花糖苷合成的关键酶基因<sup>[41-42]</sup>。王丰青等<sup>[43]</sup>依据地黄转录组数据克隆出地黄 RgTyDC cDNA 序列,并进行基因表达的时空特异性检测。索艳飞<sup>[44]</sup>通过转录组测序鉴定出 PAL、C4H、C3H、TyDC、DODC、CuHO、ALDH 与毛蕊花糖苷合成相关的酶基因 cDNA 片段。王向楠<sup>[45]</sup>基于地黄块根的转录组数据,并结合文献梳理了毛蕊花糖苷生物合成途径(图2),



(1) 分支酸变位酶 (2) 预苯酸脱水酶 (3) 预苯酸脱氢酶 (4) 苯丙氨酸转氨酶 (5) 环己烯基脱水酶 (6) 芳香酸脱氢酶 (7) 叶绿体的天冬氨酸转氨酶 (8) 线粒体的天冬氨酸转氨酶, (9) 苯丙氨酸解氨酶 (10) 4-香豆酸辅酶 A 连接酶 (11) 肉桂酸羟化酶 (12) 奎宁酸羟基肉桂酰转移酶 (13) 香豆酸-3-羟化酶 (14) 咖啡酰莽草酸酯酶 (15) 酪氨酸酶 (16) 酪氨酸脱羧酶 (17) 伯胺氧化酶 (18) 多巴胺- $\beta$ -单加氧酶 (19) 芳香乙醇脱氢酶

(1) CM: chorismate mutase [EC: 5.4.99.5] (2) ADT: arogenate/prephenate dehydratase [EC: 4.2.1.91] (3) PD: prephenate dehydrogenase [EC:1.3.1.12] (4) PAT: aspartate-prephenateaminotransferase [EC:2.6.1.79] (5) Phe: cyclohexadienyl dehydratase[EC:4.2.1.51] (6) TYRAAT: arogenate dehydrogenase [EC: 1.3.1.78] (7) ASP5: aspartate aminotransferase, chloroplastic [EC: 2.6.1.1] (8) GOT2: aspartate aminotransferase, mitochondrial [EC: 2.6.1.1] (9) PAL: phenylalanine ammonia-lyase [EC: 4.3.1.24] (10) 4CL: 4-coumarate-CoAlyase [EC:6.2.1.12] (11) C4H: cinnamate-4-hydroxylase [EC: 1.14.13.11] (12) HCT: shikimate *O*-hydroxycinnamoyltransferase [EC: 2.3.1.133] (13) C3'H: coumaroyl quinate 3'-monooxygenase [EC: 1.14.13.6] (14) CSE: caffeoylshikimate esterase [EC: 3.1.1.-] (15) TYR: tyrosinase[EC:1.14.18.1] (16) TyDc: tyrosine decarboxylase [EC: 4.1.1.25] (17) AOC3: primary-amine oxidase[EC: 1.4.3.21] (18) DBH: dopamine beta-monooxygenase [EC:1.14.17.1] (19) AAD: aryl-alcohol dehydrogenase [EC: 1.1.1.90]

图 2 毛蕊花糖苷生物合成途径

**Fig. 2** Biosynthesis of acteoside from *R. glutinosa*

确定了 19 个候选毛蕊花糖苷生物合成酶对应的基因,并对叶绿体的天冬氨酸转氨酶(ASP5)、4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL)、肉桂酸羟化酶(C4H)、香豆酸 3-羟化酶(C3'H)、伯胺氧化酶(AO)、莽草酸-肉桂酰转移酶(HCT)、预苯酸脱水酶(ADT)、线粒体的天冬氨酸转氨酶(GOT2) 8 个酶基因进行序列分析和空间特异性表达,研究表明上述酶基因与毛蕊花糖苷生物合成呈正相关。

### 3.2 地黄增产相关基因

地黄增产主要指块根的膨大程度,根系的膨大受生理(激素)、环境因素等多种因素的综合影响,但最终均通过遗传物质影响着地黄块根的膨大,包括与细胞分裂、伸长和细胞壁生长相关基因的调控。

**3.2.1 细胞分裂、伸长相关调控基因** 细胞分裂、伸长与植物形态和器官大小密切相关,并受乙烯、细胞分裂素、赤霉素、油菜素内酯和生长素等调控。通过地黄离体培养、栽培地黄和野生地黄块根发育比较,证实地黄块根的形成与发育受多种内源激素的协同作用,尤其是拉线期和块根膨大前期最为关键,期间生长素(IAA)、细胞分裂素(CK)、脱落酸(ABA)、茉莉酸(JA)、乙烯(ETH)的合成和响应基因上调与赤霉素(GA)合成基因的下调能促进块根的发育与膨大<sup>[46-48]</sup>。侯维海<sup>[49]</sup>分别克隆了 ABA、GA 合成关键酶基因 ABA8'oxs、GA20-oxs 及其代谢关键酶基因 NCED、GA2-oxs。经表达分析,在块根发育中 NCED 的上调表达能促进 ABA 合成,ABA8'oxs 则相反,而 GA 的变化主要是 GA2-oxs 表达上调后诱导降解的结果,与 GA20-oxs 的相关性不强。植物激素信号传导包括信号识别、相关基因表达及作出生理响应,如 Aux/IAA 和 ARF 是生长素信号传导必需的 2 类转录因子家族,地黄 RgIAA1 cDNA 全长 903 bp,编码 226 个氨基酸,在地黄幼叶表达量最高<sup>[50]</sup>。而 ARGOS 基因在生长素诱导下,作用于转录因子 ANT 基因的上游,并通过 ANT 基因影响细胞的分裂和伸长<sup>[51]</sup>。周延清等<sup>[52-53]</sup>根据 5 种已知植物 ARGOS 基因的保守序列克隆了液泡质子泵焦磷酸水解酶基因 RgVP、3-酮酯酰 CoA-硫解酶基因 RgHKAT 和 RgIKAT,并对部分基因进行荧光定量分析和原核表达,获得诱导表达蛋白产物,但该研究未进行转化实验,缺少对其过量表达时的功能分析。

**3.2.2 细胞壁生长相关基因** 植物细胞壁的生长,受扩展蛋白、纤维素合酶、果胶酯酶、木葡聚糖内

转糖苷酶/水解酶等调控。其中扩展蛋白是一种能诱导细胞壁松弛的特异性蛋白,在酸性条件下,能通过半纤维素降解,打断半纤维素与纤维素微纤丝之间氢键等快速缓冲细胞壁的承重网络,使细胞壁组分松弛、恢复伸展活性<sup>[54]</sup>。臧亚超等<sup>[55]</sup>从地黄块根 EST 文库中筛选到 9 个扩展蛋白基因,其中 RgExpA1 最有可能参与地黄块根木质部的形成发育,该基因含 3 个外显子和 2 个内含子,基因全长 1 262 bp,编码 259 个氨基酸,N 端富含 8 个半胱氨酸、C 端富含 5 个色氨酸保守结构域和中间 1 个组氨酸功能域。而 RgExpA10 在块根发育的早期,即在膨大期作用较大,该基因 cDNA 全长 762 bp,编码 253 个氨基酸,包含具有调控转录功能的 DPBB\_1 和与细胞膨大相关的 Pollen\_allerg\_1 结构域。植物细胞的伸长方向由细胞壁主要组成成分纤维素微纤丝的纤丝角度决定,参与纤维素微纤丝生物合成的许多酶由纤维素合酶 Cesa 基因家族编码,即纤维素合酶 CESA 蛋白。有证据表明,CESA4、CESA7 和 CESA8 作用于初生和次生细胞壁的纤维素合成<sup>[56]</sup>。周延清等<sup>[57]</sup>克隆了怀地黄纤维素合酶基因 RghBNG, cDNA 全长 548 bp,编码 93 个氨基酸,该基因与根瘤菌纤维素合酶基因同源性较高,而与其他植物纤维素合酶基因不同源,可能是地黄块根与根际根瘤菌共生过程中发生 DNA 片段转移的结果。但有关地黄果胶酯酶、木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶等基因的研究迄今未见报道。

**3.2.3 基于转录组学的块根发育机制研究** 除上述传统的研究方法外,转录组学技术也被应用于地黄块根的发育机制研究。Li 等<sup>[58]</sup>通过比较地黄苗期须根和膨大期块根的转录组数据,发现两者的染色质修饰和 DNA 复制相关基因的表达存在显著差异,这些差异的产生与其相对应的转录子含量有关,如 DNA 甲基转移酶/去甲基化酶基因在块根不同发育过程中的差异表达与其转录子含量的变量呈正相关<sup>[59]</sup>,连作地黄块根发育中 S-连作腺苷甲硫氨酸依赖的甲基转移酶、乙酰基转移酶、与组蛋白赖氨酸甲基化相关的甲基化酶等的转录子含量也发生变化<sup>[60]</sup>。此外,李明杰<sup>[61]</sup>还结合差异基因表达谱(DGE)、iTRAQ 蛋白差异表达谱筛选出块根发育关键基因及其蛋白,利用 miRNA 差异表达谱和降解组技术鉴定了调控块根发育的关键 miRNA 及其靶基因,初步阐明 miRNA 在地黄块根发育中的决定机制。

### 3.3 地黄抗逆相关基因

逆境胁迫影响着植物的生长发育,地黄逆境胁迫功能基因的研究较少,如 RghBNG 基因是一个多功能蛋白基因,除与地黄器官形成、发育有关外,对非生物胁迫胁迫、生长调节剂等也有应答反应,地黄 RghBNG 基因过表达植株的获得有助于进一步阐明该基因的功能<sup>[62-63]</sup>。地黄 RgIAA1 对不同的逆境胁迫响应水平不一,在连作时表达量升高,但受盐和渍水胁迫时表达量下降。PR 基因在植物受病原微生物侵袭或逆境胁迫时被诱导表达,地黄 RgPR-10 基因主要在根茎中表达,但其确切功能还有待确定<sup>[64]</sup>。为鉴定地黄根部响应涝胁迫关键基因,王翠英等<sup>[65]</sup>利用转录组测序和数字表达谱技术,获得 7 249 个涝胁迫地黄块根差异表达基因,其中约 35% 的基因参与乙醇发酵,乙烯合成,钙信号途径,WRKY、GRAS 和 NAC 等胁迫相关的转录因子基因上调表达,而与生长调控相关的转录子基因,如 BHLH、MYC、BYB、MADS-box 等约 65% 的基因则下调表达。

### 3.4 地黄连作障碍相关基因

研究表明,地黄根系分泌的自毒化感物质的伤害作用及根际微生物群落的失衡(如酚酸类物质能选择性地促进或抑制某些特异微生物的生长,引起的土壤原有微生物群落的失衡)是引起地黄发生连

作障碍的主要原因<sup>[66-68]</sup>。为揭示连作地黄面对自毒物质的直接伤害和微生物失衡所致的间接伤害时的分子响应机制,张重义等<sup>[69]</sup>、范华敏等<sup>[70]</sup>利用 SSH 技术构建了头茬和重茬地黄的 cDNA 消减文库,鉴定了部分响应连作障碍的特异表达基因,如钙依赖蛋白激酶基因、SAM 合成酶基因、ACC 氧化酶基因、甲基转移酶基因和钙蛋白酶基因等与钙信号传导、乙烯合成及染色质修饰相关的特异表达基因。Yang 等<sup>[60,71-72]</sup>利用地黄转录组及头茬与重茬地黄根部、叶片基因数字差异表达谱初步筛选出响应地黄连作障碍的差异表达基因,如检测到重茬地黄中钙信号体系相关蛋白基因有 2 个背向细胞质的钙离子通道下调表达,10 个朝向细胞质的钙离子通道上调表达<sup>[73]</sup>。至此,地黄连作障碍的感知、传导和响应过程被初步明确,即化感物质(如有机酸、醛类芳香酸、香豆素、醌类、生物碱和萜类等植物次生代谢产物,其中酚类和萜类化合物是高等植物的主要化感物质)被钙信号感知和传递后诱导乙烯合成,经组蛋白修饰等机制抑制地黄生命过程中关键调控基因的正常表达,引起连作障碍(图 3)。这一推测也得到内质网型  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 基因的克隆与表达<sup>[74]</sup>、地黄钙信号体系相关基因的鉴定及其在连作条件下响应特征分析<sup>[75]</sup>和连作地黄根细胞基因组的胞嘧啶甲基化<sup>[76]</sup>等研究的进一步验证。

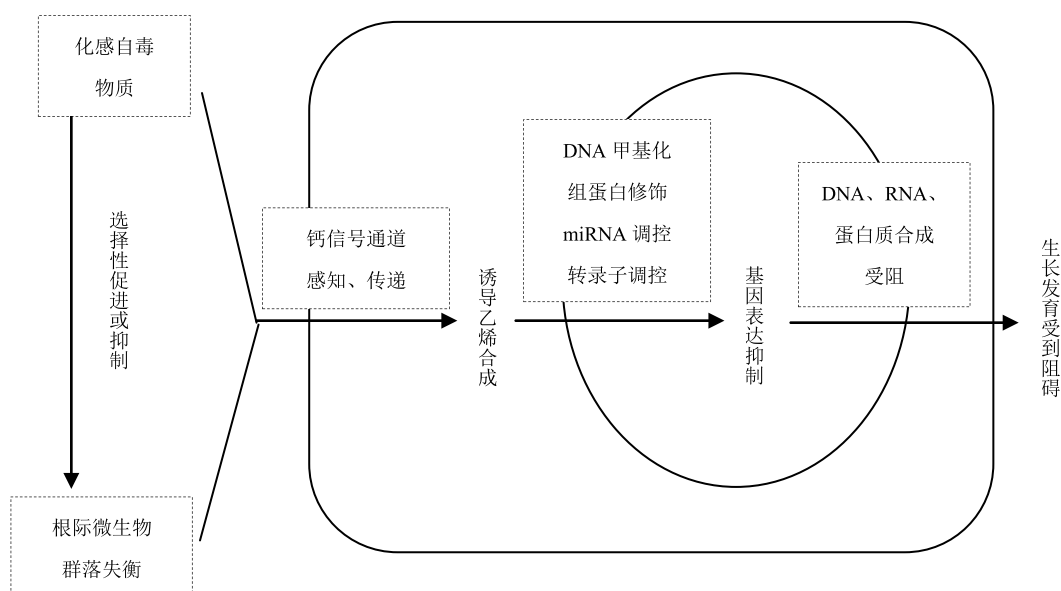


图 3 地黄连作障碍分子机制

Fig. 3 Molecular mechanism of continuous cropping obstacles of *R. glutinosa*

地黄连作障碍在本质上是属于逆境胁迫现象之一,植物在抵御或防卫逆境胁迫时,除诱导蛋白编码基因表达外,也会诱导非蛋白编码基因的表达,如 miRNAs 就是其中的重要类群,它通过引导目的基因 mRNAs 的降解和阻止翻译来调控靶基因的表达以达到对逆境的适应。近年的研究表明,重茬地黄体内存在特异 miRNAs 参与连作障碍的分子调控,包括参与连作地黄的转录调节、激素代谢、信号传导、逆境响应等。目前功能比较明确的地黄 miRNAs,主要有 miR 1851、miR 4414、miR 1118、miR 1875、miR 2672、miR Z 21、miR 830、miR 5225 等家族调控信号传导相关基因的表达,miR 1508、miR 1861/miR 4356 等家族调控营养运输相关基因的表达,miR 7811、miR 163、miR 863、miR 531、miR 5054 等家族调控细胞分裂分化相关基因的表达,miR 160、miR 165、miR 408、miR 5153、miR 171-3b/novel\_mir\_2、miR 397 等家族调控须根膨大相关基因的表达,miR 156、miR 157、miR 167 等家族调控生殖器官发育相关基因的表达<sup>[77-81]</sup>。此外,地黄类似非编码 RNA,如 mlncRNA 可能也参与地黄连作障碍的调控。刘驰<sup>[82]</sup>研究表明,重茬地黄的叶中 144 个 mlncRNA 基因表达显著上调,161 个 mlncRNA 基因下调表达,重茬地黄的根中有 330 个 mlncRNA 基因表达显著上调,164 个 mlncRNA 基因下调表达。时空表达研究表明,大部分的 mlncRNAs 表达模式与连作障碍的发病规律一致。

#### 4 展望

地黄的系统学研究,分子鉴定和功能基因研究已经取得可喜的进展,利用分子标记不但实现了地黄属植物的分子鉴定,而且也较全面地揭示了该属植物种群的遗传多样性和亲缘关系,利用转录组学研究初步揭示了地黄连作障碍的分子机制和萜类物质合成代谢的关键酶基因的研究,另外还克隆、表达了部分与地黄生长发育和抗逆相关的基因。但作为大宗药材之一,地黄的分子生物学研究还不够全面、系统,有待进一步深化。笔者认为今后地黄的分子生物学研究,第一要注重新型分子标记的开发。DNA 分子标记是生物个体在 DNA 水平上遗传差异检测的有效手段,被广泛应用于遗传多样性分析、种质资源鉴定、遗传图谱构建、QTL 定位及克隆、基因差异表达分析、基因定位及克隆、比较基因组学、系统进化研究、转基因植物鉴定及分子标记辅助育种等各个方面<sup>[83]</sup>。目前还只是随机分子标记和

少数种类的目标分子标记在地黄中得到应用,其他种类的目标分子标记、功能性分子标记和目的基因分子标记等新型地黄分子标记还有待开发。第二要注重地黄药用成分生物合成途径关键酶基因的解析及其调控机制研究,阐明地黄药用成分生物合成途径,对研究其生物合成调控机制和定向调节代谢产物合成至关重要。目前仅有 RgDXR 等少量酶基因被克隆获得基因的全长序列,至于转录后或翻译水平调控研究更是少见报道。因此,要综合运用多种组学技术,从不同侧面系统揭示地黄活性成分的遗传信息表达和调控机制,为将来利用分子生物技术、生物信息学技术等手段控制遗传信息来分析和合成药用成分打下基础。第三要注重地黄连作障碍的分子机制研究。连作障碍对地黄的生产造成重大影响,目前虽然取得了初步进展,明确了地黄连作胁迫在转录组、蛋白组和 miRNA 组等水平上均受影响,初步了解了地黄连作障碍的形成脉络,但连作障碍的形成机制非常复杂,是复杂的外界环境因子和众多的内部响应基因综合作用体现,要用系统的思维、综合运用多种方法去揭示其背后的真实规律,从而为最终发现连作障碍形成的分子机制,培育出对化感物质不敏感的新品种打下坚实基础。

#### 参考文献

- [1] 李晓东, 咎艳燕, 罗曼曼, 等. 地黄属的分类学修订 [J]. 植物科学学报, 2011, 29(4): 423-431.
- [2] 李宏庆, 刘国丽. 地黄属的一个新异名 [J]. 广西植物, 2012, 32(1): 23-26.
- [3] Kim Y S, Ryuk J A, Ko B S. Discrimination of Korean *Rehmannia glutinosa* from Chinese *Rehmannia glutinosa* using sequence-characterized amplified region marker [J]. *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 2012, 55(1): 1-6.
- [4] Zhang R X, Zhou J, Li M X, et al. Ameliorating effect and potential mechanism of *Rehmannia glutinosa* oligosaccharides on the impaired glucose metabolism in chronic stress rats fed with high-fat diet [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(5): 607-614.
- [5] Zhou Y Q, Gu F P, Zhou C E, et al. Genetic diversity of *Rehmannia glutinosa* cultivars based on sequencerelated amplified polymorphism markers [J]. *Sci Hort*, 2010, 125(4): 789-794.
- [6] Xia Z, Wang Y Z, Smith J F. Familial placement and relations of *Rehmannia* and *Triaenophora* (Scrophulariaceae S. L.) inferred from five gene regions [J]. *Am J Bot*, 2009, 96(2): 519-530.

- [7] Albach D C, Yan K, Jensen S R, *et al.* Phylogenetic placement of *Trianaophora* (fromerl Scrophulariaceae) with some implications for the phylogeny of Lamiales [J]. *Taxon*, 2009, 58(3): 749-756.
- [8] 曾淑云. 地黄属植物叶绿体基因组研究 [D]. 西安: 西北大学, 2017.
- [9] 李晓东, 李建强. 地黄属 (*Rehmannia*) 和崖白菜属 (*Trianaophora*) 植物的叶表皮形态特征 [J]. 武汉植物学研究, 2006, 24(6): 559-564.
- [10] Albach D C, Li H Q, Zhao N, *et al.* Molecular systematics and phytochemistry of *Rehmannia* (Scrophulariaceae) [J]. *Biochem System Ecol*, 2007, 35(5): 293-300.
- [11] Huang J, Zeng S Y, Zhao J H, *et al.* Genetic variation and phylogenetic relationships among *Rehmannia* (Scrophulariaceae) species as revealed by a novel set of single-copy nuclear gene markers [J]. *Biochem System Ecol*, 2016, 66(3): 43-49.
- [12] 闫 坤, 赵 楠, 李宏庆. 地黄属种间亲缘关系研究 [J]. 西北植物学报, 2007, 27(6): 1112-1117.
- [13] 夏至, 王璐静, 黄 勇, 等. 地黄属植物 DNA 条形码鉴定及地黄栽培起源研究 [J]. 中草药, 2016, 47(4): 648-654.
- [14] 李建芳, 黄 静, 程芳婷, 等. 地黄属核基因与叶绿体基因 DNA 条形码比较研究 [J]. 中草药, 2017, 48(1): 165-171.
- [15] 高素霞, 刘红彦, 王 飞. 地黄资源遗传多样性分析 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(6): 690-693.
- [16] 刘占林, 李建芳. 地黄属分子系统学分析 [J]. 西北植物学报, 2014, 34(1): 77-82.
- [17] Choi H S, Kim K S, Lee Y S, *et al.* Evaluation of genetic diversity of callus-derived plantlets of *Rehmannia glutinosa* using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) [J]. *Agric Dev Res*, 1997, 2: 143-147.
- [18] Hatano M. Genetic diagnosis of *Rehmannia* species micropropagated by tip tissue culture and an F1 hybrid by RAPD analysis [J]. *Plant Breed*, 1997, 116(2): 589-591.
- [19] 陈京荔, 黄璐琦, 邵爱娟, 等. 地黄不同品种的 RAPD 分析 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(7): 505-508.
- [20] 周延清, 景建洲, 李振勇, 等. 利用 RAPD 和 ISSR 分子标记分析地黄种质遗传多样性 [J]. 遗传, 2004, 26(6): 922-928.
- [21] 吴志刚, 王 敏, 黄璐琦, 等. 地黄不同品种遗传关系的 RAPD 分析 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(18): 1865-1869.
- [22] 王 艳, 李先恩, 李学东, 等. 野生地黄种内遗传多样性的 RAPD, ISSR 分析 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(22): 2591-2595.
- [23] 石海霞, 肖承鸿, 周 涛, 等. 地黄不同种质的遗传多样性和质量分析 [J]. 中国中药杂志, 2018, 41(7): 1577-1580.
- [24] 石海霞, 肖承鸿, 周 涛, 等. 地黄种质资源的 SCoT 分子标记遗传多样性分析 [J]. 中药材, 2018, (6): 97-100.
- [25] 郭冠瑛. 地黄大容量转录组文库的构建及 EST-SSR 标记的开发与鉴定 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2013.
- [26] 赵 楠, 李宏庆. 地黄居群遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 河南科学, 2009, 27(11): 1386-1391.
- [27] 周 鹏. 地黄 RAPD、SCAR 标记及其生物信息学分析 [D]. 新乡: 河南师范大学, 2012.
- [28] 周延清, 景建洲, 李振勇, 等. 怀区地黄遗传多样性的 ISSR 鉴定 [J]. 中草药, 2005, 36(2): 257-261.
- [29] 谷凤平. 怀地黄遗传多样性及品种鉴定的 SRAP 研究 [D]. 新乡: 河南师范大学, 2009.
- [30] 杨 珂, 周延清, 段红英, 等. 地黄 SCoT 分子标记体系的建立和指纹图谱的构建 [J]. 广西植物, 2019, 39(5): 608-614.
- [31] 程芳婷, 李忠虎, 刘春艳, 等. 地黄属植物的 DNA 条形码研究 [J]. 植物科学学报, 2015, 33(1): 25-32.
- [32] 王婉坤. 地黄 DNA 条形码序列的筛选与鉴定研究 [D]. 新乡: 河南师范大学, 2016.
- [33] 刘彦飞, 梁 东, 罗 桓, 等. 地黄的化学成分研究 [J]. 中草药, 2014, 45(1): 16-21.
- [34] 徐小博, 徐 萍, 夏 然, 等. 地黄中环烯醚萜苷的生物合成研究进展 [J]. 生物技术, 2018, 28(5): 508-512.
- [35] 朱响昊, 赵 乐, 董诚明, 等. 地黄环烯醚萜合成后修饰相关基因的挖掘与分析 [J]. 现代食品科技, 2016, 32(10): 84-89.
- [36] Sun P, Song S, Zhou L. Transcriptome analysis reveals putative genes involved in iridoid biosynthesis in *Rehmannia glutinosa* [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 10(13): 13748-13763.
- [37] 吉雪琪. 地黄中梓醇含量变化及萜类合成关键酶基因表达的初步研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2014.
- [38] 刘文晓. 地黄总环烯醚萜苷的积累及相关酶基因研究 [D]. 新乡: 河南师范大学, 2017.
- [39] 朱响昊, 董诚明, 俎梦航, 等. 地黄 RgDXR 基因的克隆及表达分析 [J]. 植物生理学报, 2017, 53(4): 563-571.
- [40] 朱响昊, 李 璐, 赵 乐, 等. 地黄次生代谢产物生物合成基因表达水平与其含量的相关性分析 [J]. 中国农业科技导报, 2018, 20(11): 36-43.
- [41] Ellis B E. Production of hydroxyphenylethanol glycosides in suspension cultures of *Syringa vulgaris* [J]. *Phytochemistry*, 1983, 22(9): 1941-1943.
- [42] 谢 峻, 崔 平, 陈启厚. 转 *RgPAL1* 基因提高地黄中

- 毛蕊花糖苷含量的方法: 中国, CN1043570480A [P]. 2015-02-18.
- [43] 王丰青, 智惊宇, 谢彩侠, 等. 地黄酪氨酸脱羧酶基因的克隆与表达分析 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(16): 2981-2986.
- [44] 索艳飞. 地黄毛状根诱导体系的建立及毛蕊花糖苷合成关键基因的鉴定 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2016.
- [45] 王向楠. 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, 2017.
- [46] 李先恩, 孙 鹏, 祁建军, 等. 地黄栽培种与野生种内源激素含量的差异 [J]. 作物学报, 2013, 39(7): 1276-1283.
- [47] 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): 3245-3252.
- [48] 薛建平, 葛德燕, 张爱民, 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.
- [49] 侯维海. 地黄 ABA、GA 和部分寡糖合成代谢关键酶基因克隆与表达分析 [D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2011.
- [50] 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.
- [51] Hu Y X, Xie Q, Chua N H. The Arabidopsis auxin-inducible gene *argos* controls lateral organ size [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(9): 1951-1961.
- [52] 周延清, 张永华, 张 喻, 等. 怀地黄 3-酮酯酰 CoA-硫解酶基因的克隆、序列特征和时空表达分析 [J]. 中草药, 2013, 44(1): 76-84.
- [53] 周延清, 张永华, 陈艳梅, 等. 怀地黄液泡质子泵焦磷酸水解酶基因的克隆与生物信息学分析 [J]. 河南农业科学, 2013, 42(3): 107-111.
- [54] 陈爱国, 陈进红. Expansin 的研究进展 [J]. 植物学通报, 2003, 20(6): 752-758.
- [55] 臧亚超, 孙 鹏, 杨太新, 等. 地黄扩展蛋白基因 *RgExpA1* 的克隆与表达分析 [J]. 生物技术通报, 2012, (4): 69-73.
- [56] Manoj K, Laxmi M, Paul C, *et al.* Exploiting cellulose synthase (*CESA*) class-specificity to probe cellulose microfibril biosynthesis [J]. *Plant Physiol*, 2018, 177(1): 151-167.
- [57] 周延清, 张 喻, 李静云, 等. 地黄纤维素合酶基因的克隆与生物信息学分析 [J]. 江苏农业科学, 2015, 43(1): 21-24.
- [58] 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 Experim Bot*, 2015, 66(19): 5837-5851.
- [59] 廖登群, 祁建军, 李先恩, 等. 地黄甲基转移酶/去甲基化酶基因的注释及其在块根发育过程中的表达分析 [J]. 中国科技论文, 2017, 12(18): 2135-2140.
- [60] Yang Y H, Li M J, Li X Y, *et al.* Transcriptome-wide identification of the genes responding to replanting disease in *Rehmannia glutinosa* L. roots [J]. *Mol Biol Rep*, 2015, 42(5): 881-892.
- [61] 李明杰. 基于地黄转录组的 EST-SSR 标记开发及块根发育机理研究 [D]. 新乡: 河南农业大学, 2013.
- [62] Zhou Y Q, Zhang Y H, Wei J, *et al.* Cloning and analysis of expression patterns and transcriptional regulation of *RghBNG* in response to plant growth regulators and abiotic stresses in *Rehmannia glutinosa* [J]. *Springer Plus*, 2015, 1(4): 1-8.
- [63] 周延清, 杨 珂, 张 喻, 等. 地黄基因 *RghBNG* 转化地黄过表达研究 [J]. 湖北农业科学, 2017, 56(17): 3342-3344.
- [64] 孙 鹏, 郭玉海, 祁建军, 等. 地黄 *RgPR-10* 基因的克隆与表达 [J]. 西北农业学报, 2009, 18(1): 300-304.
- [65] 王翠英, 李鑫宇, 王潇然, 等. 地黄根部响应涝胁迫关键基因的鉴定 [J]. 中国现代中药, 2017, 19(2): 232-242.
- [66] 张重义, 陈 慧, 杨艳会, 等. 连作对地黄根际土壤细菌群落多样性的影响 [J]. 应用生态学报, 2010, 21(1): 2843-2848.
- [67] 杜家方, 尹文佳, 李 娟, 等. 连作地黄根际土壤中酚酸类物质的动态变化 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(8): 948-952.
- [68] Wu L K, Wang J Y, Huang W M, *et al.* Plant-microbe rhizosphere interactions mediated by *Rehmannia glutinosa* root exudates under consecutive monoculture [J]. *Sci Rep*, 2015, 5(2): 158-171.
- [69] 张重义, 范华敏, 杨艳会, 等. 连作地黄 cDNA 消减文库的构建及分析 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(3): 276-280.
- [70] 范华敏, 李明杰, 郑红艳, 等. 地黄中响应连作基因的时空表达与分析 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(20): 2029-2035.
- [71] Yang Y H, Zhang Z Y, Fan H M, *et al.* Construction and analysis of different expression cDNA libraries in *Rehmannia glutinosa* plants subjected to continuous cropping [J]. *Acta Physiol Plant*, 2013, 35(3): 645-655.
- [72] Yang Y H, Li M J, Chen X J, *et al.* De novo characterization of the *Rehmannia glutinosa* leaf transcriptome and analysis of gene expression associated

- with replanting disease [J]. *Mol Breed*, 2014, 34(3): 905-915.
- [73] 郭冠瑛, 李明杰, 王鹏飞, 等. 地黄连作障碍中钙信号系统的异常变化分析 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(10): 1471-1478.
- [74] 刘 驰, 李明杰, 王鹏飞, 等. 地黄内质网型 (ER)  $Ca^{2+}$ -ATPase 基因的克隆及表达分析 [J]. 植物生理学报, 2013, 49(5): 445-451.
- [75] 杨楚韵, 李鑫宇, 李明杰, 等. 地黄钙信号体系相关基因的鉴定及其在连作条件下响应特征分析 [J]. 药学学报, 2017, 52(12): 1951-1961.
- [76] Yang Y, Li M. DNA Methylation in *Rehmannia glutinosa* roots suffering from replanting disease [J]. *Int J Agric Biol*, 2016, 18(1): 160-167.
- [77] Xu H X, Chen J Y, Chen X J, et al. Differential miRNA expression in *Rehmannia glutinosa* plants subjected to continuous cropping [J]. *BMC Plant Biol*, 2011, 11(1): 29-39.
- [78] Yang Y H, Chen X J, Chen J Y, et al. Identification of novel and conserved microRNAs in *Rehmannia glutinosa* L. by solexa sequencing [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2011, 29(4): 986-996.
- [79] Li M J, Yang Y H, Chen X J, et al. Transcriptome/degradomewide identification of *R. glutinosa* miRNAs and their targets: The role of miRNA activity in the replanting disease [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68531.
- [80] 杨艳会. 地黄转录组的构建及响应连作障碍关键基因和特异 miRNAs 的鉴定 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2011.
- [81] Yang Y H, Li M J. Cloning, molecular characterization, and expression analysis of a nucleoporin gene (rgNUP98-96) from *Rehmannia glutinosa* [J]. *Genet Mol Res Gmr*, 2015, 14(4): 13022-13030.
- [82] 刘 驰. 地黄 mRNA-like ncRNAs (mlncRNAs) 的鉴定及在连作障碍中的差异表达 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2013.
- [83] 熊发前, 蒋 菁, 钟瑞春, 等. 分子标记技术的两种新分类思路及目标分子标记技术的提出 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(10): 60-64.