

· 专题论坛 ·

地黄DNA分子标记与基因功能研究进展

周延清*, 王婉琬, 王向楠, 段红英

河南师范大学生命科学学院, 绿色药材生物技术河南省工程实验室, 新乡 453007

摘要 地黄(*Rehmannia glutinosa*)是一种具较高药用价值和经济价值的植物。有关地黄的种质资源、遗传育种、种植、化学成分和药效、有效成分的提取和分析、植物组织培养和脱毒快繁等已有很多报道, 但地黄核酸分子生物学研究尚少。该文从DNA分子标记、转录组学、基因功能和基因工程技术等方面对地黄核酸分子生物学研究进展进行综述, 并分析其发展趋势。

关键词 核酸分子生物学, 地黄, 转录组, 基因工程技术, 中药

周延清, 王婉琬, 王向楠, 段红英 (2015). 地黄DNA分子标记与基因功能研究进展. 植物学报 50, 665–672.

地黄(*Rehmannia glutinosa*)是玄参科地黄属一种重要的药用植物, 分布于中国、韩国和日本等地(Kim et al., 2012)。在中国, 地黄分布于河南、山东、陕西和山西等地, 但以河南的怀地黄最为著名, 质量最优(Zhou et al., 2010)。地黄块根富含梓醇、糖类、苷类(如毛蕊花糖苷)、维生素、多种氨基酸和多种微量元素, 是一种应用广泛的中药, 具有滋阴健肾、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功效(Sun et al., 2010; Kim et al., 2012; Zhang et al., 2014), 其经济价值很高。由于长年的营养繁殖, 造成其品质退化, 产量下降(李明军等, 2006)。有关地黄增产和改良品质的研究备受重视。随着分子生物学技术的飞速发展, 地黄分子生物学, 尤其是地黄核酸分子生物学研究不断深入, 取得了越来越多的成果。本文从DNA分子标记、转录组学、基因功能和基因工程技术等方面对地黄核酸分子生物学研究新进展进行综述, 以期为相关研究人员提供参考。

1 地黄DNA分子标记

DNA分子标记是指能够反映生物个体或者种群间基因组中或cDNA中某种差异特征的DNA或cDNA片段, 可以在DNA水平上直接反映生物个体之间的遗传变异。DNA分子标记被广泛应用于分子遗传图谱构建、

种质鉴定、遗传多样性评价、重要基因定位和图位克隆、功能基因组学研究、转基因植物鉴定与分子标记辅助选择育种等方面(熊发前等, 2010)。地黄DNA分子标记技术研究与应用始于1997年, 其后不断发展。从1997年至2011年, 地黄研究中使用的分子标记较多, 其中基因组DNA分子标记有RAPD、ISSR (周延清等, 2004)、ITS (李宏庆, 2005)、AFLP (祁建军, 2007)和SRAP (Zhou et al., 2010); 叶绿体基因组DNA标记有*rbcL*、*ndhF*、*rps16*和*trnL-F*序列(Kim et al., 2012)。上述研究局限在地黄遗传多样性评价、分类、鉴定、指纹图谱、居群遗传关系、结构及诊断茎尖快速繁殖地黄品种和F₁代杂种等方面(Choi, 1997; 周延清等, 2004; 李宏庆, 2005; 吴志刚等, 2007; 谷凤平等, 2009; 赵楠和李宏庆, 2009)。近年来, SCAR标记应用于区别中、韩地黄(Kim et al., 2012)和鉴别中国地黄品种(周鹏等, 2012); 应用ITS2条形码序列可准确、快速鉴定中药材地黄及其同属密切相关种(侯典云等, 2013); 通过构建地黄微卫星富集文库开发出地黄基因组SSR标记(程月琴, 2013); 基于转录组测序技术开发出地黄EST-SSR标记, 并用于评价地黄品种多态性(郭冠瑛, 2013)。

2 地黄转录组分析

地黄RNA是地黄DNA的转录产物。从地黄组织中提取

收稿日期: 2014-10-13; 接受日期: 2015-05-30

基金项目: NSFC-河南人才培养联合基金(No.U1304304)和河南省教育厅科学技术研究重点项目(No.14B180028)

* 通讯作者。E-mail: yqzhou@htu.edu.cn

RNA的浓度和质量对逆转录PCR、RACE、Northern blot、半定量PCR、实时定量PCR、cDNA文库构建、cDNA-AFLP、cDNA-SRAP和转录组测序等后续实验的成功至关重要,因此建立有效的地黄RNA提取技术意义重大。在地黄RNA提取方面,多采用试剂盒方法(侯维海, 2011; 刘驰等, 2013; 周延清等, 2013; 张喻, 2014)。但在使用时最好同时比较几种不同公司的试剂盒,从中筛选出针对地黄某种组织效果最佳的试剂盒,针对地黄特定组织的结构特点和组成成分,提取RNA的得率高且质量好。另外,研究人员还根据既有的植物RNA提取方法和试剂盒开发出适于地黄特异组织或所有组织的RNA提取技术。例如,孙鹏等(2008a)研制出适用于从地黄块根、茎和叶3种组织器官有效提取RNA的方法,并且用此方法提取了完整性和纯度都比较好的RNA;郭兰(2012)以地黄试管块根为材料,比较了皂土法、CTAB法、异硫氰酸胍法、RNAiso plus和改进的SDS/酚法提取RNA的实验结果,发现皂土法提取的地黄试管块根RNA的得率和质量均最佳,适合于后续的核酸分子生物学研究。

miRNA是一类非编码的单链小分子RNA,在植物的生长发育、逆境适应和代谢调控等过程中发挥着至关重要的作用。因此,miRNA在地黄生长发育中的作用备受研究者的青睐。Yang等(2011a)利用Solexa测序技术构建小RNA文库,获得大量地黄miRNAs,从中鉴定出7个新的miRNAs和89个保守的miRNAs。张重义等(2013)用生物信息学方法建立了地黄miRNA表达谱,并从中寻找到一些连作地黄miRNA。郭冠瑛(2013)利用Solexa测序技术分别在根中和叶中获得99 708条和94 544条转录组序列,根叶联合拼接获得94 479条地黄转录组序列,进而从中获得87 665条转录本,其中最片段达8 009 bp,最片段长204 bp。根据miRNA家族在不同物种中的保守性,赵春丽等(2014)将miRBase数据库中的已知植物miRNA与通过高通量测序获得的93 172条地黄EST序列进行同源比对,按照miRNA前体应具备的标准进行筛选,获得了潜在的地黄miRNA分子,进而采用实时荧光定量PCR技术对8条预测的miRNA序列进行了检测,证实这8条miRNA在地黄中真实存在。王宇亮等(2012)根据已知生地黄miRNA序列设计合成6条特异的LNA反义寡核苷酸探针,采用地高辛标记和通用植物miRNA提取试剂盒和血液miRNA提取试剂

盒提取新鲜地黄和服用生地黄水煎剂后人体血液的总RNA,通过Northern blot方法验证了生地黄植物体内存在miRNA,生地黄水煎剂中地黄的miR5140、miR5137和miR5141可通过消化道进入人体血液。这为研究miRNA在中药疗效中的作用机制提供了新的思路和策略。

3 地黄基因功能研究

3.1 地黄药效相关基因

孙鹏等(2012)通过454高通量测序技术获得了数万条地黄EST序列,生物信息学分析发现其中含有所有萜类骨架生物合成相关基因和4个环烯醚萜途径基因。他们对部分异戊二烯转移酶基因进行了荧光定量PCR分析,发现地黄中可能含有半乳糖磷酸酯酶(GPP)基因,暗示了环烯醚萜合成途径的复杂性以及环烯醚萜途径I和II在环烯醚萜生物合成初期阶段具有共同的酶促步骤(Sun et al., 2012)。侯维海(2011)用RT-PCR和RACE技术克隆了地黄水苏糖、蔗糖合成和代谢的关键酶基因,用qRT-PCR技术分析它们的组织特异性,结果表明,其表达量与地黄块根、茎和叶中糖的含量相关。Yang等(2011a)利用软件对8条地黄miRNA的靶基因进行预测,发现其靶基因主要编码与地黄代谢过程相关的蛋白。

3.2 地黄增产和器官膨大发育相关基因

张永华(2013)用兼并引物RT-PCR和RACE技术克隆了1个地黄增产基因,即怀地黄液泡质子泵焦磷酸水解酶基因*RgVP*,并且用qRT-PCR分析其时空表达。臧亚超等(2012a)用RT-PCR和RACE技术克隆了地黄扩展蛋白基因*RgExpA1*,并用qRT-PCR技术分析了它的组织特异性表达。此外,研究人员还从地黄转录组数据库中筛选出细胞分裂素-N-葡萄糖基转移酶基因、腺苷酸异戊烯基转移酶基因、顺式玉米素-O-葡萄糖基转移酶基因、单加氧酶基因CYP72A56、正调控因子ARR1基因和细胞分裂素受体基因等细胞分裂素相关基因,吡啶-3-乙酸一酰氨基合成酶基因、邻氨基苯甲酸合酶基因、生长素转运蛋白基因和生长素诱导蛋白5NG4基因等生长素相关基因,类固醇5 α -还原酶基因和油菜素内酯氧化酶基因等油菜素内酯相关基因,赤霉素2- β -双加氧酶1和赤霉素2- β -双加氧酶8

基因等赤霉素相关基因。进一步用qRT-PCR技术研究其在地黄块根膨大发育中的调控作用(<http://www.xzbu.com/1/view-6200742.htm>); 用RT-PCR和RACE技术克隆了地黄脱落酸、赤霉素及其代谢的关键酶基因, 用qRT-PCR技术分析它们的组织特异性表达, 结果表明, 其表达量与地黄块根、茎和叶中激素含量相关, 表明它们在地黄器官形成、发育及成熟中具有重要作用(侯维海, 2011)。孙鹏等(2009)用SSH方法构建了地黄块根差减文库, 鉴定出199个地黄块根发育相关EST, 并对其中11个进行了表达分析, 尤其对*RgPR-10*基因在地黄不同组织和原核表达进行了研究。Yang等(2011a)利用软件对8条地黄miRNA的靶基因进行预测, 发现其靶基因主要编码与生长发育相关的蛋白。范华敏等(2012)通过分别提取正茬和重茬地黄的总RNA, 反转录合成cDNA, 利用SSH构建了连作地黄的正反消减cDNA文库, 并且从地黄cDNA消减文库中获得了大量与连作障碍相关的EST序列, 其中456条是有差异的EST; 他们用生物信息学技术预测出31类基因, 再通过相关基因的时空表达与显著性分析获得了在各个时期各个组织中表达的10个基因, 它们分别编码S-腺苷甲硫氨酸合成酶、钙依赖性蛋白激酶、氨基环丙烷羧酸氧酶、RNA结合蛋白、甲基转移酶、RNA依赖的RNA聚合酶、钙蛋白酶、RNA复制酶、细胞周期蛋白D、依赖于DNA的RNA聚合酶IIa。

3.3 地黄特有的与抗逆相关的基因

张永华(2013)和周延清等(2013)分别用兼并引物RT-PCR和RACE技术克隆地黄*RghBNG*基因, 经生物信息学分析表明, 该基因与已知数据库中公布的生物基因核苷酸序列没有同源性, 而其推测的蛋白质氨基酸序列与一类B12D蛋白和另一类未知功能蛋白的氨基酸序列有相当高的同源性, 进而用qRT-PCR分析其时空表达。张喻(2014)测定地黄*RghBNG*基因对铬、汞和盐等非生物因子及赤霉素、NAA和6-BA等植物生长调节剂的应答反应, 发现该基因与地黄生长发育、响应非生物胁迫和植物生长激素相关; 之后用基因工程技术实现其原核表达(张永华, 2013)和亚细胞定位(张喻, 2014)。研究人员摸索出一套基因功能研究的方法——利用数据库中核酸序列资源和生物信息学技术或称其为电子克隆技术克隆基因, 利用实时荧

光定量PCR技术验证其功能。例如, 王丰青等(2013)克隆了地黄Aux/IAA家族基因*RgIAA1*, 发现其具有Aux/IAA家族蛋白的典型结构域和序列特征, 在连作时*RgIAA1*的表达量升高, 而且*RgIAA1*的表达量受NaCl和渍水的胁迫而降低。Yang等(2011a)利用软件对8条地黄miRNA的靶基因进行预测, 发现其靶基因主要编码与地黄胁迫响应等过程相关的蛋白基因。

3.4 地黄连作障碍相关基因

Yang等(2013, 2014)构建了连作地黄的分别含232个和214个cDNA片段的正、反向消减文库, 对其中16个cDNA片段的时空表达进行分析, 发现连作干扰了 Ca^{2+} 信号转导和乙烯合成的起始, 抑制了DNA复制、RNA转录和蛋白质合成, 消除地黄块根中 Ca^{2+} 信号阻滞剂可以减缓地黄连作障碍综合征。Yang等(2011a)利用Solexa方法测序并用qRT-PCR分析从正茬和重茬地黄中提取保守miRNAs和新型miRNAs, 预测前者有29个成员差异表达, 作用于308个靶基因; 而后者有3个成员差异表达, 作用于7个靶基因, 在正茬和重茬地黄之间构建了miRNAs差异表达谱。同时, 他们预测了7个新的地黄miRNAs对应转录因子基因、甲基转移酶基因、UDP葡萄糖基转移酶家族蛋白基因、磷脂酰环己六醇-4-磷酸5-磷酸肌酸肌酶家族蛋白基因、F-box家族蛋白基因、甘油磷酸二酯酶基因和细胞色素P450酶家族基因等24个靶基因。郭冠瑛等(2013)从连作地黄数字差异表达谱文库与地黄转录组中挖掘出差表达的钙信号体系相关蛋白基因, 利用实时荧光定量PCR技术对钙信号系统相关基因进行时空表达分析, 利用不同浓度的钙信号阻断剂(异搏定、肝素钠)处理重茬地黄, 获得12个钙信号系统相关基因, 包括2个背向细胞质的钙离子通道和10个朝向细胞质的钙离子通道以及钙信号响应元件的CBL、CBP、CIBP和PLC等关键基因。在构建地黄转录组文库、抑制消减杂交文库及地黄相关EST文库的基础上, 刘驰等(2013)利用拼接、延伸及PCR方法, 成功克隆到1个全长2 681 bp的 Ca^{2+} -ATPase基因, 含有2 007 bp完整的开放阅读框, 编码568个氨基酸, 属于内质网型ATPase, 含有 Ca^{2+} 转运区和ATP结合区等保守区。随着生长, 正茬地黄中该基因的表达量逐渐升高, 而连作地黄中其在块根伸长期表

达突然升高,之后降低。

3.5 其它功能基因

此外,一些科研工作者对其它地黄基因功能进行了研究。例如,孙鹏等(2008a)通过RT-PCR方法克隆了12个地黄内参基因,并且用qRT-PCR技术分析其mRNA表达差异情况;周延清等(2012b)和张喻(2014)以地黄基因组DNA为模板,分别用PCR技术和HiTAIL-PCR技术克隆了怀地黄基因片段及其中转座酶基因与启动子序列。

4 地黄基因工程技术

自1983年转基因抗卡那霉素烟草(*Nicotiana tabacum*)诞生以来,植物转基因技术不断在不同植物种中取得进展,成绩斐然(杨维才,2013)。地黄基因工程技术研究也取得了长足发展。在转入地黄的功能基因方面,已经有烟草花叶病毒外壳蛋白基因和黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因(<http://www.wyzxsx.com/Article/Class18/201009/180283.html>)、*GUS*基因(李萌萌,2007;臧亚超,2012;臧亚超等,2012b;王丰青等,2014)、地黄扩展蛋白基因*RgExpA1*(臧亚超,2012)、新霉素磷酸转移酶基因(*NPTII*)、花生白藜芦醇合酶基因(*AhRS3*)(Lim et al., 2005)、肉桂醇脱氢酶基因(*CAD*)(Moon et al., 2005)、发根农杆菌*rolB*基因(Zhou et al., 2009; Hwang, 2009)和*rolC*基因(Piatczak et al., 2012)、潮霉素标记基因(王丰青等,2014)、棉花谷胱甘肽-S-转移酶*GST*基因(*Gh5*)(Lim et al., 2003)和地黄花叶病毒外壳蛋白基因(刘志刚,2007)等转入地黄。在目的基因运载体、限制性内切酶和农杆菌菌株方面,使用了野生型发根农杆菌*Ri*质粒,如发根农杆菌菌株A4和15834(Zhou et al., 2009; Hwang, 2009; Piatczak et al., 2012),人工改造的发根农杆菌菌株*Ri*质粒,如LBA940bin19(Zhou et al., 2009),以及人工改造的Ti质粒。如将花生*RS3*基因的*XbaI*和*Clal*的双酶切片段克隆到双元植物转化载体pGA643,转入根癌农杆菌菌株LBA4404(Kim et al., 2001)。臧亚超(2012)将地黄扩展蛋白基因*RgExpA1*克隆到植物表达载体pPZP3425中,获得pPZP-3425-*RgExpA1*重组超表达载体,进而将其导入根癌农杆菌菌株LBA4404,获得工程菌,用于转化地黄。

李萌萌(2007)和王丰青等(2014)将*GUS*基因分别克隆到植物表达载体pCambia1305和pCABMA-1301,转入根癌农杆菌LBA4404,获得工程菌。Lim等(2003)用*NcoI*与*SacI*双酶切生长素调节的棉花(*Gossypium hirsutum*)谷胱甘肽-S-转移酶*GST*基因(*Gh5*)所在的cDNA,获得具有*NcoI/SacI*的*Gh5*基因,克隆到表达载体pRTL2,构建1个NT107基因盒,然后将其切下,亚克隆到双元转化载体pCNG1578上,获得重组载体pCNG-*Gh5*,转化根癌农杆菌菌株EHA-101,鉴定出工程菌,用于转化地黄。张喻(2014)将地黄*RghBNG*基因两端加上*PstI*和*HindIII*位点,克隆到双元表达载体pCambia1302上*PstI/HindIII*位点,转入根癌农杆菌菌株GV3101,获得工程菌。在地黄遗传转化体系和转基因方法方面,研究人员已成功建立了地黄叶片、叶柄及根的遗传转化体系(Lim et al., 2005; Moon et al., 2005; 李萌萌,2007; Zhou et al., 2009; Hwang, 2009; 臧亚超,2012; Piatczak et al., 2012),并创立了地黄农杆菌介导法和基因枪法转化地黄的转基因方法,获得了转基因植株或者发状根(Lim et al., 2005; Moon et al., 2005; Zhou et al., 2009; Hwang, 2009; 臧亚超,2012; 臧亚超等,2012b; Piatczak et al., 2012; 范红军等,2013; <http://www.wyzxsx.com/Article/Class18/201009/180283.html>; 王丰青等,2014)。其中多项研究成果对地黄性状的遗传改良有重要作用。中国中医科学院黄璐琦研究团队从1997年开始“转烟草花叶病毒外壳蛋白基因和黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因抗毒地黄”研究至今(<http://www.wyzxsx.com/Article/Class18/201009/180283.html>),用农杆菌介导法和基因枪法获得了2个转入烟草花叶病毒外壳蛋白基因和黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因的转基因地黄株系,对烟草花叶病毒和黄瓜花叶病毒具有良好的抗性。范红军等(2013)用发根农杆菌转化怀地黄获得转基因地黄突变体并进行了品系的遗传分析。Lim等(2005)用根癌农杆菌介导法分别获得转新霉素磷酸转移酶基因(*NPTII*)和*GUS*基因的地黄植株以及转花生白藜芦醇合酶基因和抗尖孢镰刀菌的转基因地黄植物;他们还用根癌农杆菌介导法将生长素调节的棉花谷胱甘肽-S-转移酶*GST*基因(*Gh5*)转入中国地黄,探讨了影响地黄遗传转化的因素,如农杆菌与地黄外植体共培养时间,乙酰丁香酮、暗培养和卡那霉素的浓度,优化了地黄农杆菌介

导的基因转化体系,经PCR鉴定发现转基因地黄基因组中存在988-bpGh5基因,表达GST的转基因地黄叶GST活性比对照高约3倍,这为地黄抗胁迫育种提供了可能(Lim et al., 2003)。Piatczak等(2012)用发根农杆菌A4菌株感染地黄茎尖和叶,获得使用其T-DNA中*rolB*和*rolC*基因的特异引物进行PCR验证的10个发状根品系,并且采用HPLC-ESI-MS测定其中环烯醚萜苷类(梓醇、梓实甙、马钱苷和桃叶珊瑚甙)与苯乙醇苷类(毛蕊花糖甙和异毛蕊花糖甙)的含量。其中,有些高产发状根品系中马钱苷、梓实甙、毛蕊花糖甙和异毛蕊花糖甙的含量均比非转化发状根和一年生地黄块根高,且梓实甙、毛蕊花糖甙和异毛蕊花糖甙的含量比后者高7倍,而有些品系中却只能检测到微量的梓醇和桃叶珊瑚甙。

5 研究展望

我国在地黄核酸分子生物学研究领域已经取得了令人振奋的成果,而且在某些方面处于国际前沿,如转录组学研究揭示地黄连作障碍分子机制和萜类物质合成代谢基因研究。但是,其大多数研究相对于如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)和小麦(*Triticum aestivum*)等生物而言,还相当滞后,有待更全面、系统且深入的研究。笔者认为未来地黄核酸分子生物学研究可以在以下3个方面展开。(1) 地黄DNA分子标记有待补充和完善,需要开发新的标记,加强应用研究。迄今,地黄DNA分子标记研究只使用随机分子标记和少数种类的目标分子标记,其它种目标分子标记、目的基因分子标记和功能性分子标记(熊发前等, 2010)尚未见报道。另外,利用DNA分子标记技术进行地黄重要基因定位和图位克隆、功能基因组学与分子标记辅助选择育种等方面的研究也报道较少。因此,开发和使用新型地黄分子标记、加强地黄DNA分子标记的应用是DNA分子标记研究的当务之急。(2) 需要进一步挖掘新型RNA分子,深化地黄RNA分析技术与功能分析。目前,地黄RNA主要有两种类型(mRNA和miRNA)已在功能方面对其进行了探索,但是,地黄RNA的种类、研究技术和功能远不止这些。例如,地黄长链非编码RNA,此类分子广泛参与生物的生长、发育、生理、病理和抗逆过程(王婉琬等, 2014)。此外,建立地黄

RNA剪接、cDNA-AFLP和cDNA-SRAP等,地黄RNA功能与调控技术的建立与应用也至关重要。(3) 加强实施地黄基因组计划,综合基因功能分析和基因工程技术研究,解析地黄有效成分(如梓醇和毛蕊花糖苷等)的合成途径,选育地黄新品种。药用植物有效成分生物合成途径的解析和药用植物优良品种的选育将对我国天然药物的研发和中药产业的发展产生巨大而深远的影响。在前期地黄基因组计划研究过程中,通过PCR、RT-PCR和RACE、构建文库及转录组测序结合生物信息学等技术获得了相当数量的地黄基因或者ESTs,但是,在其基因挖掘的方法和功能验证水平上还不全面,有待丰富。例如,在分离基因方法方面尚未见利用DNA分子标记技术进行地黄重要农艺性状基因和药效成分合成基因的定位与图位克隆的报道;在基因功能验证水平上,多使用生物信息学技术预测功能,用qRT-PCR技术验证,而实验验证多在转录水平上进行时空表达分析和胁迫应答反应。

综上所述,今后既要继续用上述有效技术,又要探索和利用新的技术,如蛋白质组学和代谢组学技术,挖掘更多的功能基因,如抗病毒基因和主要有效药用成分合成代谢基因等,进一步深入研究其功能和作用机理,进而将其转入地黄,研发新品种,应用于农业生产。今后可重点利用代谢工程技术在实验室合成地黄有效成分,进行合成生物学研究,尝试解释其在地黄连作障碍的成因和解决方法以及在地黄产量与质量形成中的作用问题,以期从根本上改变我国地黄研发与推广应用的困局,从源头上开创地黄研发与应用的新天地。

参考文献

- 程月琴, 焦振彬, 张佩, 叶永忠, 王红卫 (2013). 地黄微卫星富集文库构建及特性分析. 种子 32(5), 12-16.
- 范红军, 姚换灵, 张永华, 周延清, 张喻, 李静云, 陈娟娟 (2013). 发根农杆菌T-DNA诱变怀地黄突变体或品系的遗传学分析. 河南师范大学学报(自然科学版) 41(5), 115-119.
- 范华敏, 李明杰, 郑红艳, 杨艳会, 古力, 王丰青, 陈新建, 张重义 (2012). 地黄中响应连作基因的时空表达与分析. 中国中药杂志 37, 3029-3035.
- 谷风平, 周春娥, 路淑霞, 姚换灵, 王芳, 段红英, 周

- 延清 (2009). 怀地黄SRAP分子标记体系的建立与DNA指纹图谱的构建. 河南师范大学学报(自然科学版) **37**, 175–178.
- 郭冠瑛 (2013). 地黄大容量转录组文库的构建及EST-SSR标记的开发与鉴定. 硕士论文. 郑州: 河南农业大学. pp. 23–26.
- 郭冠瑛, 李明杰, 王鹏飞, 王丰青, 何华勤, 李娟, 郑红艳, 陈新建, 张重义 (2013). 地黄连作障碍中钙信号系统的异常变化分析. 中国中药杂志 **38**, 1471–1478.
- 郭兰 (2012). 地黄试管块根诱导条件优化及其RNA的抽取. 硕士论文. 淮北: 淮北师范大学. pp. 23–27.
- 侯典云, 辛天怡, 杨培, 姚辉 (2013). 应用ITS2条形码鉴定中药材地黄. 世界科学技术: 中医药现代化 **15**, 441–445.
- 侯维海 (2011). 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. 硕士论文. 乌鲁木齐: 新疆农业大学. pp. 1–40.
- 侯维海, 孙鹏, 陈全家, 李先恩 (2011). 地黄实时定量PCR内参基因的筛选. 中国农学通报 **27**(17), 76–82.
- 李宏庆 (2005). 地黄属分类学与系统学研究. 博士论文. 上海: 华东师范大学.
- 李萌萌 (2007). 地黄高频再生体系的建立及遗传转化体系的初步研究. 硕士论文. 北京: 中国中医科学院. pp. 6–9.
- 李明军, 徐鑫, 夏民, 张晓丽, 柳俊, 谢从华 (2006). PP333与BA组合对怀地黄试管苗生长发育的影响. 植物学通报 **23**, 56–59.
- 刘驰, 李明杰, 王鹏飞, 杨艳会, 王丰青, 张重义, 李春奇, 陈新建 (2013). 地黄内质网型(ER)Ca²⁺-ATPase基因的克隆及表达分析. 植物生理学报 **49**, 445–451.
- 刘志刚 (2007). 甘薯G病毒和地黄花叶病毒外壳蛋白基因对甘薯和地黄遗传转化的研究. 硕士论文. 新乡: 河南师范大学. pp. 1–50.
- 祁建军 (2007). 地黄种质遗传关系及根际土壤微生物多样性研究. 博士论文. 北京: 中国协和医科大学. pp. 1.
- 孙鹏, 郭玉海, 祁建军, 周莉丽, 李先恩 (2008a). 一种适用于地黄不同组织器官的RNA提取方法. 中国农学通报 **24**(4), 29–32.
- 孙鹏, 郭玉海, 祁建军, 周莉丽, 李先恩 (2008b). 地黄肌动蛋白基因片段的克隆与序列分析. 安徽农业科学 **36**, 8470–8471, 8474.
- 孙鹏, 郭玉海, 祁建军, 周莉莉, 张苗苗, 李先恩 (2009). 地黄*RgPR-10*基因的克隆与表达. 西北农业学报 **18**, 300–304.
- 孙鹏, 周莉莉, 李先恩 (2012). 地黄转录组分析及萜类萜生物合成相关基因的挖掘. 中国科技论文在线, <http://www.paper.edu.cn>.
- 王丰青, 田云鹤, 李明杰, 杨金凤, 张宝, 林文雄, 陈新建, 张重义 (2013). 地黄*Aux/IAA*家族基因*RgIAA1*的克隆和表达分析. 中国中药杂志 **38**, 4033–4039.
- 王丰青, 田云鹤, 谢彩侠, 杜家方, 李烜桢, 张留记, 何华勤, 张重义 (2014). 根癌农杆菌介导的怀地黄遗传转化研究. 中草药 **45**, 2541–2546.
- 王婉坤, 周延清, 苑璐璐, 李静云, 陈娟娟 (2014). 植物长链非编码RNA的研究进展. 贵州农业科学 **42**(10), 59–63.
- 王宇亮, 王颖芳, 杨泽民, 王光昀, 韩彬, 贾真, 陈艳芬, 胡旭光 (2012). 丹参、生地黄中miRNA在人体血液中分离、鉴定及表达分析. 中国实验方剂学杂志 **18**(19), 121–124.
- 吴志刚, 王敏, 黄璐琦, 刘红彦, 王飞, 袁庆军 (2007). 地黄不同品种遗传关系的RAPD分析. 中国中药杂志 **32**, 1865–1869.
- 熊发前, 蒋菁, 钟瑞春, 韩柱强, 贺梁琼, 李忠, 庄伟建, 唐荣华 (2010). 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. 中国农学通报 **26**(10), 60–64.
- 杨维才 (2013). 植物转基因技术——回顾与前瞻. 植物学报 **48**, 6–9.
- 臧亚超 (2012). 地黄扩展蛋白基因*RgExpA1*的克隆及遗传转化体系的优化. 硕士论文. 保定: 河北农业大学. pp. 18–43.
- 臧亚超, 孙鹏, 杨太新, 李先恩 (2012a). 地黄扩展蛋白基因*RgExpA1*的克隆与表达分析. 生物技术通报 (4), 69–73.
- 臧亚超, 杨太新, 李先恩, 孙鹏 (2012b). 农杆菌介导的地黄遗传转化体系的优化. 中国农学通报 **28**, 218–222.
- 张永华 (2013). 地黄基因*RgVP*、*RghKAT*、*RglKAT*与*RghBNG*的克隆和表达. 硕士论文. 新乡: 河南师范大学. pp. 1–40.
- 张喻 (2014). 地黄*RghBNG*基因的结构分析和功能验证. 硕士论文. 新乡: 河南师范大学. pp. 1–50.
- 张重义, 李明杰, 陈新建, 吴林坤, 李娟, 王丰青, 李振方, 郭冠瑛, 林文雄 (2013). 地黄连作障碍机制的研究进展与消减策略. 中国现代中药 **15**, 38–44.
- 赵春丽, 李先恩, 都晓伟, 孙鹏 (2014). 地黄microRNAs和靶基因的生物信息学预测及验证. 中草药 **8**, 1129–1135.
- 赵楠, 李宏庆 (2009). 地黄居群遗传多样性的ISSR分析. 河南科学 **27**, 1386–1391.
- 周鹏 (2012). 地黄RAPD-SCAR标记及其生物信息学分析. 硕士论文. 新乡: 河南师范大学. pp. 1–40.
- 周延清, 景建洲, 李振勇, 张宝华, 贾敬芬 (2004). 利用RAPD和ISSR分子标记分析地黄种质遗传多样性. 遗传 **26**, 922–928.

- 周延清, 姚焕灵, 段红英, 周春娥, 张永华, 陈艳梅, 张喻 (2012a). 怀地黄基因片段及其中转座酶基因的克隆与序列分析. 河南农业科学 **41**, 106–109.
- 周延清, 张永华, 张喻, 陈艳梅, 白妍妍, 魏海方, 段红英, 周春娥 (2013). 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. 中草药 **44**, 76–84.
- 周延清, 周鹏, 郭静佩, 张永华, 陈艳梅, 张喻, 杨德勇, 许春 (2012b). DNA分子标记技术在四大怀药研究中的应用概况. 河南农业科学 **41**(2), 21–25.
- Choi HS (1997). Evaluation of genetic diversity of callus-derived plantlets of *Rehmannia glutinosa* using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Agric Dev Res* **2**, 143–147.
- Hwang SJ (2009). Catapol production in Chinese Foxglove (*Rehmannia glutinosa* Libos.) hairy roots transformed with *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834. *Methods Mol Biol* **547**, 263–273.
- Kim YS, Ryuk JA, Ko BS (2012). Discrimination of Korean *Rehmannia glutinosa* from Chinese *Rehmannia glutinosa* using sequence-characterized amplified region marker. *J Korean Soc Appl Biol Chem* **55**, 1–6.
- Lim JD, Sung ES, Yang DC, Yun SJ, Chung IM, Kim MJ, Yu CY (2003). *Agrobacterium* mediated transformation of *Rehmannia glutinosa* L. with glutathione S-transferase gene (Gh-5). *Korean J Medicinal Crop Sci* **11**, 289–297.
- Lim JD, Yang DC, Yun SJ, Chung IM, Sung ES, Kim MJ, Heo K, Yun CY (2001). Isolation and biological activity of Resveratrol-3-O- β -D-Glucoside in transgenic *Rehmannia glutinosa* L. transformed by peanut resveratrol synthase gene (RS3). *Korean J Medicinal Crop Sci* **12**, 406–414.
- Lim JD, Yun SJ, Chung IM, Yu CY (2005). Resveratrol synthase transgene expression and accumulation of resveratrol glycoside in *Rehmannia glutinosa*. *Mol Breed* **16**, 219–233.
- Moon YR, Park MR, Hyun DY, Chun JC, de los Reyes BG, Yun SJ (2005). Expression of cinnamyl alcohol dehydrogenase gene in response to stresses and phytohormones in *Rehmannia glutinosa*. *Korean J Breed* **37**, 138–146.
- Piątczak E, Królicka A, Wielanek M, Wysokińska H (2012). Hairy root cultures of *Rehmannia glutinosa* and production of iridoid and phenylethanoid glycosides. *Acta Physiol Plant* **34**, 2215–2224.
- Sun P, Guo YH, Qi JJ, Zhou LL, Li XN (2010). Isolation and expression analysis of tuberous root development related genes in *Rehmannia glutinosa*. *Mol Biol Rep* **37**, 1069–1079.
- Sun P, Song SH, Zhou LL, Zhang B, Qi JJ, Li XN (2012). Transcriptome analysis reveals putative genes involved in iridoid biosynthesis in *Rehmannia glutinosa*. *Int J Mol Sci* **13**, 13748–13763.
- Yang YH, Chen XJ, Chen JY, Xu HX, Li J, Zhang ZY (2011a). Identification of novel and conserved microRNAs in *Rehmannia glutinosa* L. by Solexa sequencing. *Plant Mol Biol Rep* **29**, 986–996.
- Yang YH, Chen XJ, Chen JY, Xu HX, Li J, Zhang ZY (2011b). Differential miRNA expression in *Rehmannia glutinosa* plants subjected to continuous cropping. *BMC Plant Biol* **11**, 53–56.
- Yang YH, Li MJ, Chen XJ, Wang PF, Wang FQ, Lin WX, Yi YJ, Zhang ZW, Zhang ZY (2004). De novo characterization of the *Rehmannia glutinosa* leaf transcriptome and analysis of gene expression associated with replanting disease. *Mol Breeding* **34**, 905–915.
- Yang YH, Zhang ZY, Fan HM, Zhao YD, Li MJ, Li J, Chen JY, Lin WX, Chen XJ (2013). Construction and analysis of different expression cDNA libraries in *Rehmannia glutinosa* plants subjected to continuous cropping. *Acta Physiol Plant* **35**, 645–655.
- Zhang RX, Zhou J, Li MX, Ma HG, Qiu JG, Luo XH, Jia ZP (2014). Ameliorating effect and potential mechanism of *Rehmannia glutinosa* oligosaccharides on the impaired glucose metabolism in chronic stress rats fed with high-fat diet. *Phytomedicine* **21**, 607–614.
- Zhou YQ, Duan HY, Zhou CE, Li JJ, Gu FP, Wang F, Zhang ZY, Gao ZM (2009). Hairy root induction and plant regeneration of *Rehmannia glutinosa* Libosch. f. *hueichingensis* Hsiao via *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. *Russ J Plant Physiol* **56**, 224–231.
- Zhou YQ, Gu FP, Zhou CE, Yao HL, Duan HY, Wang F, Liu YJ, Xing YH, Chu SX (2010). Genetic diversity of *Rehmannia glutinosa* cultivars based on sequence-related amplified polymorphism markers. *Sci Hortic* **125**, 789–794.

Recent Progress in DNA Molecular Markers and Gene Functions of *Rehmannia glutinosa*

Yanqing Zhou^{*}, Wanshen Wang, Xiangnan Wang, Hongying Duan

Engineering Laboratory of Biotechnologies for Green Medicinal Plants, Henan Province, College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China

Abstract *Rehmannia glutinosa* is an important medicinal plant; its tuberous root or processed material is widely used in traditional Chinese medicine. It has many functions such as nourishing yin and invigorating the kidney, adjusting the immune system, reducing inflammation, detoxification, ameliorating hypoglycemia, enriching the blood, resisting cancer, promoting muscle growth, and anti-aging. Many studies have investigated *R. glutinosa* germplasm resources, breeding and cultivation, chemical ingredients and functions, active ingredient isolation and analysis, tissue culture and virus-free propagation. Relatively few studies have investigated its nucleic acid molecular biology. This paper reviews studies of the DNA molecular markers, transcriptome, gene functions, and genetic engineering of *R. glutinosa* and trends in research.

Key words nucleic acid molecular biology, *Rehmannia glutinosa*, transcriptome, genetic engineering, traditional Chinese medicine

Zhou YQ, Wang WS, Wang XN, Duan HY (2015). Recent progress in DNA molecular markers and gene functions of *Rehmannia glutinosa*. *Chin Bull Bot* **50**, 665–672.

^{*} Author for correspondence. E-mail: yqzhou@htu.edu.cn