

· 中药农业 ·

地黄叶片响应遮阴处理的分子响应机制解析[△]李明杰^{1,2}, 谢彩侠^{1,3}, 古力^{1,2}, 杨超飞⁴, 杜家方⁴, 王丰青^{4*}, 张重义^{1,2*}

1. 福建农林大学 农学院, 福建 福州 350002;

2. 福建农林大学 作物遗传育种与综合利用教育部重点实验室, 福建 福州 350002;

3. 河南中医药大学 药学院, 河南 郑州 450046;

4. 河南农业大学 农学院, 河南 郑州 450002

[摘要] 目的: 分析遮阴后地黄叶片中差异表达的基因, 揭示地黄响应遮阴的分子机制。方法: 对地黄“温85-5”植株进行60%遮阴、90%遮阴和全光照3种处理, 以Ion Proton平台对90%遮阴和全光照2种处理的样品进行转录组测序, 筛选差异表达的基因。结果: 遮阴后地黄叶片变平展, 泡状凸起减少或变小, 叶片变薄, 叶肉栅栏组织和海绵组织细胞减少、变小。同时, 有2393个基因在遮阴处理的叶片中差异表达, 其中, 遮阴后上调表达的基因有1456个, 而下调的基因有937个。京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析发现植物-真菌互作代谢通路、苯乙醇苷生物合成通路、萜类成分合成通路、光合作用通路等120个代谢通路相关的差异基因得到了富集。在遮阴后的叶片中, 参与光合作用的差异基因全部下调表达, 生长素响应蛋白基因(*ARF*)上调表达, 赤霉素(GA)通路*DELLA*基因下调表达, 乙烯通路苏氨酸蛋白激酶基因(*CTR1*)上调表达, 参与梓醇与毛蕊花糖苷合成通路的催化酶基因表达与它们遮阴后含量的变化规律也有一定的相关性。结论: 分析了遮阴后地黄叶片的转录组信息, 筛选到一些差异表达的基因, 为进一步解析地黄遮阴响应的分子机制奠定基础。

[关键词] 地黄; 遮阴; 叶片; 差异基因**[中图分类号]** R282.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2020)07-1080-11**doi:**10.13313/j.issn.1673-4890.20190828006Analysis of Molecular Mechanisms of *Rehmannia glutinosa* Leaf in Response to Shading TreatmentLI Ming-jie^{1,2}, XIE Cai-xia^{1,3}, GU Li^{1,2}, YANG Chao-fei⁴, DU Jia-fang⁴, WANG Feng-qing^{4*}, ZHANG Zhong-yi^{1,2*}

1. College of Agriculture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

2. Key Laboratory for Genetics, Breeding and Multiple Utilization of Crops, Ministry of Education, Fujian Agriculture and Forest University, Fuzhou 350002, China;

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

4. College of Agronomy; Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

[Abstract] **Objective:** To reveal the molecular regulation of *Rehmannia glutinosa* leaf in response to shading, and explore key genes related to shading resistance. **Methods:** High through-put transcriptome sequencing by Ion Proton was performed to screen differentially expressed genes (DEGs) using leaves of ‘Wen 85-5’ under full light, 60% shading and 90% shading treatments. **Results:** Shading lessened bulges of *R. glutinosa* leaves, decreased the thickness of leaves, and reduced the cell number of palisade and spongy tissues. Totally, 2393 DEGs were determined between full light vs. 90% shading, with 1456 up-regulated genes and 937 down-regulated genes. These DEGs with a KEGG pathway annotation were enriched into 120 KEGG pathways, including plant-pathogen interaction, phenylpropanoid biosynthesis, terpenoid biosynthesis and photosynthesis, etc. In 90% shading leaves, all of differentially expressed genes involved in photosynthesis were down-regulated, nine of auxin response factor genes involved in auxin signaling pathway were up-regulated, ten *DELLA* genes involved in GA signaling pathway were down-regulated, and five *CTR1* genes involved in

[△] [基金项目] 国家重点研发计划项目(2017YFC1700705); 国家自然科学基金项目(81473299, 81872950, 81603243)* [通信作者] 张重义, 教授, 研究方向: 中药资源生态与中药材生产技术; Tel: (0591)83742793, E-mail: zyzhang@fafu.edu.cn
王丰青, 副教授, 研究方向: 中药资源分子生物技术与新品种选育; Tel: (0371)56990188, E-mail: heauzyqcxw@126.com

ethylene signaling pathway were up-regulated. After shading treated, the expression changes of enzyme genes involved in catapol and acteoside biosynthesis were related to their accumulation. **Conclusion:** In this study, we identified some key genes after shading treated by RNA-Seq, which will lay foundation to elucidate the molecular regulation of *R. glutinosa* leaf in response to shading.

[**Keywords**] *Rehmannia glutinosa*; shading; leaf; differentially expressed genes

药用植物与栖息地生境的相互作用是药用植物次生代谢产物合成的重要原因。其中,光照是影响药用植物生长发育、形态建成的核心生态因子,也是植物初生和次生代谢途径的重要驱动因子。药用植物所处生态区域的海拔、坡向、经纬度不同,其所受到光照辐射参数也存在明显的差异。药用植物在长期适应特定地区的光照尺度变化过程中,逐渐的适应并固化这些光照特质,形成了不同光照需求度和喜光特性以及特定外形^[1]。因此,光照条件对于特定生态区中外源迁徙和驯化植物的成功生存起着极其重要的作用,是决定植物能否成功驯化并进化的重要决定性因素之一^[2]。因此,光照也成为药用植物道地性形成过程中最为重要的生境支配因素之一。目前,光照强度对阴生药用植物影响的研究相对较多,但大部分研究集中在最适光强、光质的筛选以及光照对药用植物活性成分诱导性效应;但光照是如何调控药用植物发育和影响药用植物次生代谢合成的,其具体机制尚不清晰。

地黄 *Rehmannia glutinosa* L. 是玄参科植物,以块根入药,始载于《神农本草经》,被列为上品,为常用大宗药材。地黄药材味甘、苦,性寒,归心、肝、肾经,功用清热生津、凉血、止血。道地产区为古“怀庆府”,即今河南焦作地区,包括温县、武陟、博爱、沁阳等沁河两岸部分县区^[3-4]。目前,在道地产区常年都有很大的种植面积,产值达数十亿元。在非道地产区山西、山东、河北也有较大的种植面积,甘肃、黑龙江等省份也有种植。地黄是典型的喜光药用植物之一,合适的光照强度对于地黄植株的形态建成、块根发育和药用成分合成起着极其重要的作用。在地黄的栽培生产实践中,充足的光照是保证地黄产量和品质的重要前提条件之一。前期研究发现地黄叶片和根组织中均含有毛蕊花糖苷、梓醇等地黄的代表性药用活性成分,而遮阴则能显著影响地黄的叶片发育,同时,导致其中毛蕊花糖苷的含量降低,遮阴程度越高其降低幅度越大^[3]。为了进一步详细探究光照强度与地黄叶片发育和次生代谢产物的累积机制间的关联性,本研

究以地黄作为研究材料,通过遮阴的方法人为模拟出不同光照强度条件,探究不同光照强度对地黄生长发育的影响;同时,用转录组测序技术(RNA-Seq)解析不同光照强度对地黄转录水平的扰动效应,从分子水平上探究光照强度对地黄叶片发育及内在代谢机制的影响。以期阐明光照因子对药用植物代谢积累机制奠定基础,同时,也为道地药材的形成机制和建立合理的耕作制度研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料与遮阴处理

选用地黄品种“温 85-5”作为遮阴处理对象,经河南中医药研究院张留记研究员鉴定,所用实验材料为 *R. glutinosa* L.。受试地黄“种栽”播种于河南农业大学农场隔离实验田内,生长发育期间的栽培管理措施与大田生产保持严格一致。在地黄出苗 30 d 后,利用不同透光水平的遮阴网进行梯度遮阴处理。具体操作方法如下:设置 3 个处理组,每组处理选择 80~100 株地黄苗。在地黄出苗后 30 d 左右,保留 1 组地黄在正常光照下进行生长(全光照),剩余 2 组地黄则分别进行 60% 和 90% 的遮光处理,3 组处理平行进行实验。所有处理分别在遮阴处理后的 30、60、150 d 取样,每处理随机取 10 株长势一致植株,详细统计其叶长、叶宽及叶片数等叶部关键参数。选取不同处理下 30 d 的叶组织制备石蜡切片,详细观察其组织结构的差异,同时,将 90% 遮阴及全光照射样品用液氮冻存,进行下游的 RNA-Seq 转录组测序,获取遮阴处理下叶内的关键分子响应进程。

1.2 RNA-Seq 及分析

用 TRIzol 法提取不同遮阴处理地黄叶的总 RNA,利用 DNase I 去除样品总 RNA 中残存 DNA 片段。然后,利用嵌有 Oligo(dT)接头的磁珠对样品中的 mRNA 进行富集。对富集出的 mRNA 进行片段化处理,并以这些碎片化的 mRNA 为扩增模板,反转录为 cDNA。cDNA 样品在经过末端修复、测序接头

添加、特定片段切胶回收、多轮扩增及纯化等一系列步骤后,完成测序文库的制备。利用 Agilent 2100 Bioanalyzer 和 ABI Step One Plus Real-Time PCR System 对所已经构建的测序文库的质量和产量进行评测,将经过质控检测的文库进行高通量测序(华大基因),选用 Ion Proton 平台进行测序。

对测序所获取的原始数据(raw reads)进行质控处理,过滤掉其中低质量、接头等污染序列,获取 clean reads 序列。将 clean reads 与地黄参考序列库进行比对,统计不同样品的 reads 比对率以及分布,进一步评估不同样品所获取的 reads 序列中外源序列污染水平。在此基础上,根际地黄参考序列中 reads 匹配数来计算不同样品转录本的表达水平,表达量用 FPKM 表示。对比分析遮阴前后地黄叶片中转录本的表达水平,获取响应遮阴处理的特异响应基因,并对其进行 GO 和 KEGG 富集分析,获取遮阴处理下地黄叶片内关键分子响应进程。

1.3 实时荧光定量 PCR

提取不同处理叶片的总 RNA,利用反转录试剂盒(TaKaRa,大连)进行 cDNA 第一链合成。反转录体系: < 2 μg 总 RNA, 1 μL oligo dT Primer ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 0.5 μL RNAase Inhibitor($40 \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 1 μL dNTP Mixture, 4 μL 5 $\times$ PrimeScript II Buffer, 1 μL 的 PrimeScript II RTase($200 \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 加 ddH₂O 补充至 20 μL 。在 42 $^{\circ}\text{C}$ 60 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 的条件下进行反转录。以不同差异基因的编码区序列为模板设计 qPCR 引物(见表 1),选用 *RgTIP41* 基因作为内参。利用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH

Plus)(Takara, 大连)荧光实时定量 PCR 试剂盒对不同基因的表达量进行分析。qPCR 采用 25 μL 反应体系,包括 2 μL 上述反转录 cDNA, 1 μL 上游引物($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 1 μL 下游引物($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 12.5 μL SYBR[®] Premix Ex Taq, 8.5 μL ddH₂O。具体反应程序设置: 95 $^{\circ}\text{C}$ 下 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 下 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 下 30 s, 循环数 40。反应结束后,导出不同样品的扩增 C_t 循环数,利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法来计算不同转录本的相对表达水平。

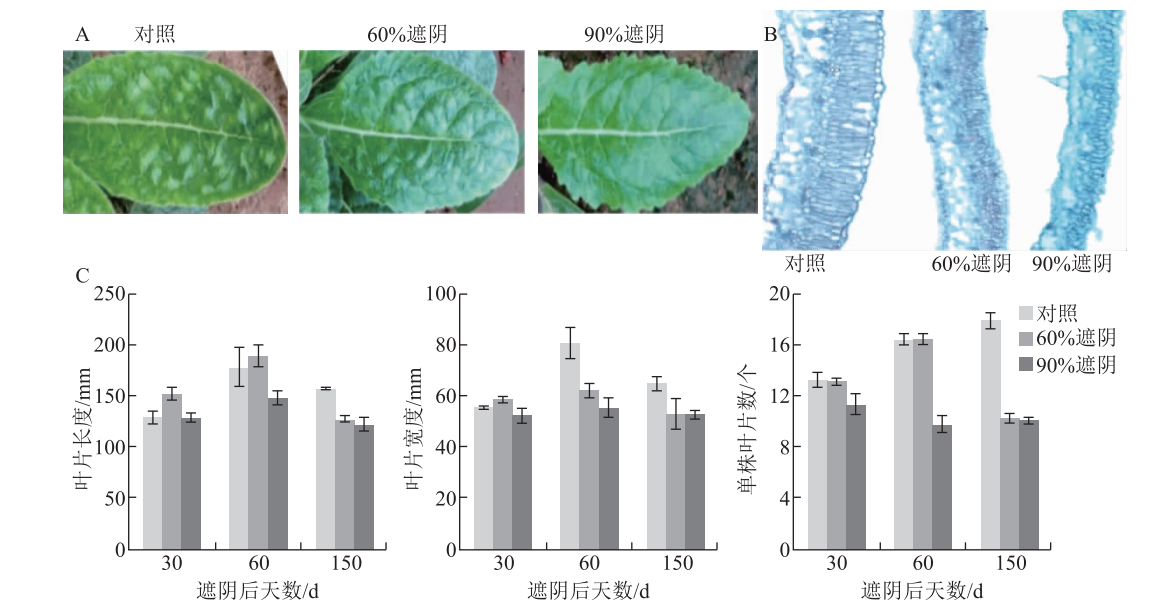
2 结果与分析

2.1 遮阴对地黄叶片的表型和组织解构的影响

为了详细了解不同光照强度对地黄叶片生长和发育影响,在大田条件下,在其他因素不变情况下,分别用 60%、90% 的遮阴网对地黄进行人为的遮阴处理。结果发现,遮阴后地黄的生长受到明显的影响。遮阴后地黄叶片变平展,叶色由黄绿变深绿(见图 1A)。叶片上的泡状凸起减少或变小,且随着遮阴程度的增加而消失(见图 1A)。叶片变薄,叶肉栅栏组织和海绵组织细胞减少、变小(见图 1B)。遮阴 30 d 后,2 种遮阴叶片大小与对照相差不多,但叶片数量减少;遮阴 60 d 时,90% 遮阴的叶片长度、宽度和叶片数均显著低于 60% 遮阴和未遮阴对照;150 d 时,60% 和 90% 遮阴的叶片长度、宽度和叶片数均显著低于未遮阴对照(见图 1C)。说明遮阴对地黄地黄部叶片的生长有着显著的影响,且随着遮阴程度的增加和遮阴时间的延长表型变化更加明显。

表 1 用于确认 RNA-Seq 差异表达基因准确性的 qPCR 引物

关键基因 ID	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	产物/bp
<i>RgEXPA8</i> (Unigene10535)	TACTAGCTACAACGTCGCAC	TAGAGCCACAGCCCTTAGAG	197
<i>RgEXPA1</i> (Unigene13756)	TGTGGGAAAGAACTTCAGGG	CCTCTAACTTCTGCAAATTCCTC	186
<i>RgMYB</i> (Unigene21429)	ATACCATCACAGGAAGTGGGA	AGACCATTATTGCCAATCCCC	166
<i>RgERF</i> (Unigene2558)	TCCCTCACAGATTGGCTTG	ATTGGCTCTCAACTTCCAGC	168
<i>RgA-AAR</i> (CL3002. Contig2)	TGCCTGGAATGACAGGATATG	AATCTTCGGCACCTTCTTCC	138
<i>RgWRKY</i> (CL4160. Contig2)	CCAATTGTTGCAGCCATGAA	ATAGCCCAAGCTTCTGTTC	169
<i>RgBRI-KI</i> (CL4599. Contig2)	CAGCACCTGCTTCGATGATA	TGCTATCACTCGTGTTCGTC	90
<i>RgCAD</i> (CL379. Contig1)	GCGTTTCTGATTAGCTCCGA	ACCACAATCAGCTTCCCATC	140
<i>RgTIP41</i>	TGGCTCAGACTTGATGGAGTG	TCTCCAGCAGCTTTCTCGGA	105



注：A. 遮阴对地黄叶片泡状凸起的影响；B. 遮阴对地黄叶片解剖结构的影响；C. 遮阴对地黄叶片长度、宽度和叶片数的影响。

图 1 遮阴对地黄叶片生长的影响

2.2 遮阴对地黄叶内的关键细胞进程的影响

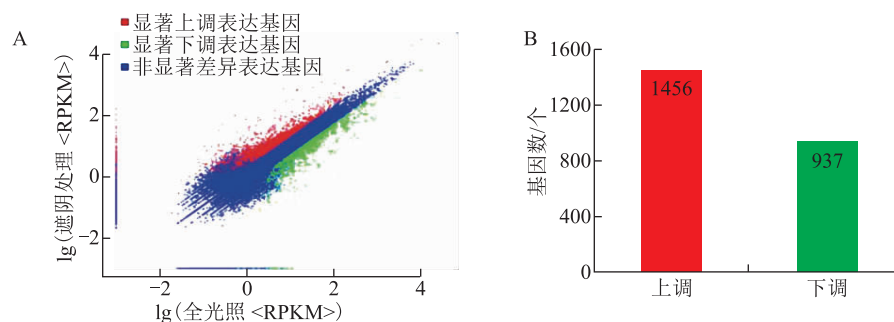
为了深入解析遮阴处理对地黄叶片内在分子进程的影响，选取对地黄叶片表型和组织解构具有明显影响的 90% 遮阴处理，通过 RNA-Seq 技术详细分析其与正常叶片间的响应基因差异。结果在全光照地黄、90% 遮阴的地黄的叶中分别获取了 11 865 182 和 10 606 388 个 clean reads (见表 2)。将这些序列与前期已经构建的地黄转录组库进行比对，发现全光照和遮阴处理叶中分别有 98.99% 和 98.91% 的 clean reads 可以匹配到转录组上，其中，特异匹配的序列分别占到总序列的 76.00%

和 75.32%。从 2 个样品的 reads 匹配率可以明显看出，2 个样品中所产生的 clean reads，有 98% 以上的序列可以匹配到地黄转录组，说明 2 个样品的测序质量均达到了较高水平，可以进行下游的定量分析。

为了进一步获取遮阴处理和正常光照间的差异响应基因，分别将遮阴处理样品和对照样品的基因进行定量，同时，进行差异显著性分析。结果发现有 2393 个基因在 90% 遮阴处理和对照间出现差异表达，其中，有 1456 个基因在遮阴处理后叶内显著上调，有 937 个下调 (见图 2)。为了确证这些通

表 2 遮阴处理地黄和对照地黄叶片 RNA-seq 测序结果统计

处理	总 clean reads	匹配转录组的 reads	匹配率/%	特异匹配的 reads	匹配率/%
全光照	11 865 182	11 745 778	98.99	9 017 656	76.00
90% 遮阴	10 606 388	10 490 818	98.91	7 989 208	75.32



注：A. 遮阴处理地黄与正常光照处理地黄间显著差异表达基因分析；B. 遮阴处理地黄与正常光照处理地黄间显著差异表达基因数量。

图 2 遮阴处理与正常光照 (全光照) 地黄叶片间显著差异表达基因的鉴定与筛选

过数字基因表达分析所获取差异基因的准确性,从上述显著差异表达的基因中挑选 *RgWRKY* (CL4160. Contig2)、*RgBRI-KI* (CL4599. Contig2)、*RgA-AAR* (CL3002. Contig2)、*RgERF* (Unigene2558)、*RgMYB* (Unigene21429)、*RgEXPA8* (Unigene10535)、*RgEXPA1* (Unigene13756) 和 *RgCAD* (CL379. Contig1) 等8个基因,利用 qRT-PCR 方法对其进行定量。结果发现 qRT-PCR 与通过数字基因表达谱分析中所获取的上、下调基因的差异表达趋势基本一致,相关系数达到 0.936 (见图3),这表明本研究通过数字基因表达谱方法所鉴定差异基因是较为可靠的。

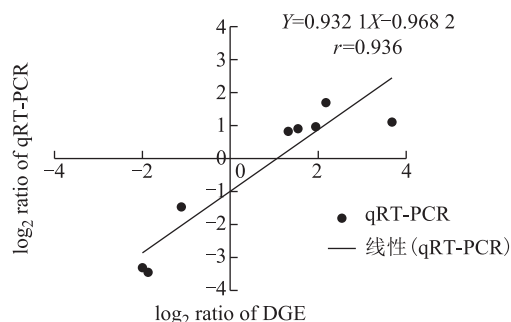


图3 RNA-seq 数据与 qRT-PCR 结果的相关性分析

2.3 地黄叶片中响应遮阴处理关键基因的功能分析

为了解析遮阴处理下地黄叶片中关键表达基因功能,将已经获取差异表达基因进行 GO 和 KEGG

功能注释。GO 功能分类主要从分子功能 (molecular function)、细胞位置 (cellular component)、生物进程 (biological process) 3 个层级上来描述相应基因的功能。详细分析遮阴处理和对照间差异基因的 GO 的功能分类发现:在生物进程分类中有 22 个 GO 条目匹配了相应差异基因,其中,细胞代谢进程 (metabolic process) 和细胞进程 (cellular process) 条目中所包含的基因数量最多,而细胞节律 (rhythmic process) 和细胞杀伤性 (cell killing) 条目中基因最少。在细胞位置分类中,共有 11 类 GO 条目匹配了相应基因,其中,细胞 (cell)、细胞部位 (cell part) 2 个条目中所匹配的基因数量相对较多,细胞器 (organelle) 条目中较少,细胞连接 (cell junction)、胞外区部位条目中所占基因数量最少。此外,在分子功能分类中,共有 10 类 GO 条目匹配了相应基因,其中,催化活性 (catalytic activity)、结合 (binding) 条目所匹配的基因最多,其次为转运活性 (transporter activity),其它 7 类 GO 条目所匹配基因总数均在 50 以下 (见图4)。上述结果表明遮阴处理影响了地黄叶内的多重细胞进程。

同时,为进一步深入解析遮阴处理内叶片差异响应基因功能,利用 KEGG 数据库对所获取的差异基因所涉及的代谢通路进行分析。结果发现遮阴处理与对照间有 1278 个差异表达基因可以富集归类到 120 个代谢进程中,占总差异基因的 53.4%,有 23 个

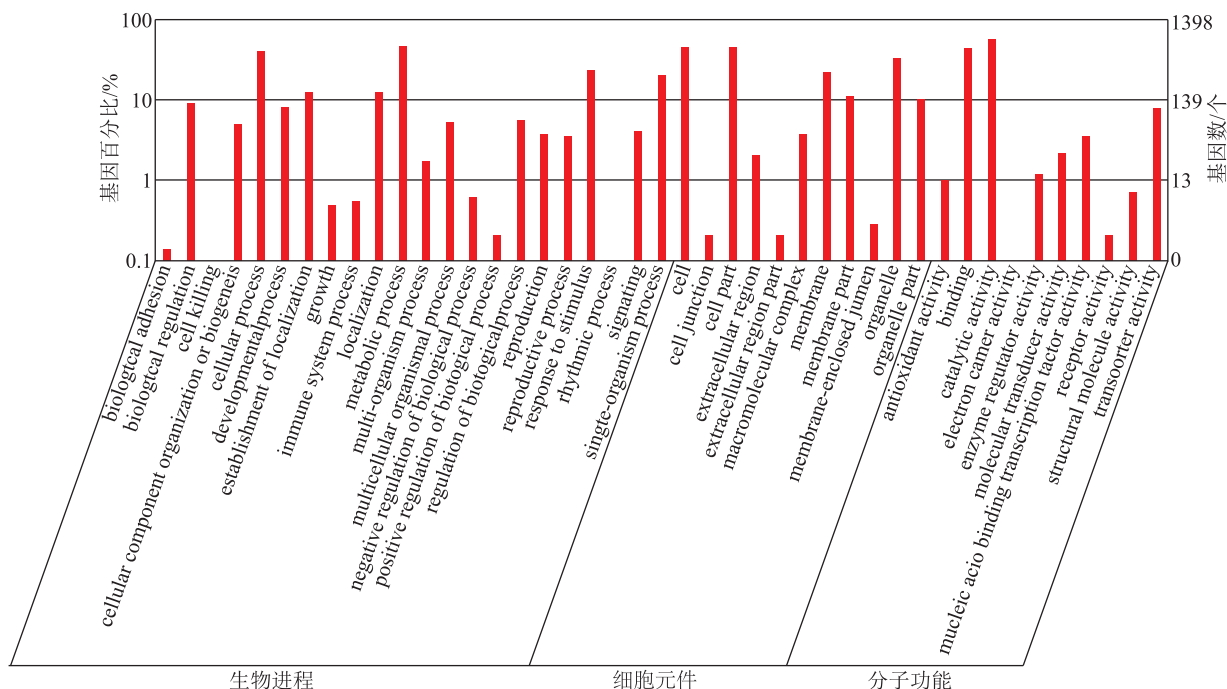


图4 遮阴后地黄叶片中差异表达的基因 GO 分类

代谢通路达到了显著富集水平($P < 0.05$)(见表 3)。其中,有 139 个差异基因在真菌和植物互作进程中(Plant-pathogen interaction)显著富集,占到总差异基因的 10.88%,这侧面反应了遮阴可能引发了植物叶片内应激逆境响应。有 104 个差异表达基因在植物激素信号转导(Plant hormone signal transduction)通路中显著富集,这说明遮阴处理扰动了地黄叶片中正常激素信号系统响应,间接影响了叶片的正常生长发育。有 59 个差异表达基因在苯乙醇苷类物质生物合成(Phenylpropanoid biosynthesis)通路也被显著富集,这表明遮阴处理可能影响了地黄叶片中次生代谢产物的正常合成。此外,值得注意的是,与淀粉与蔗糖代谢(Starch and sucrose metabolism)、类胡萝

卜素生物合成(Carotenoid biosynthesis)、黄酮类物质的生物合成(Flavonoid biosynthesis)、单萜类物质的生物合成(Monoterpenoid biosynthesis)以及倍半萜和三萜类物质的生物合成(Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis)等初生、次生代谢进程密切关联的通路中也显著富集了大量差异表达基因,这表明遮阴处理显著影响了地黄初生代谢以及次生代谢产物正常合成进程,从而间接的影响了地黄叶内干物质的积累以及关键药用活性成分的累积。总之,通过遮阴处理下关键差异基因的功能途径的初步解析,为进一步了解地黄叶片生长发育、逆境胁迫和次生代谢产物积累的分子调控机制研究提供了关键参考信息。

表 3 遮阴处理后差异基因富集的前 25 个代谢通路

序号	代谢通路	差异基因数/个	占比/%	通路编号
1	Plant-pathogen interaction	139	10.88	ko04626
2	Protein processing in endoplasmic reticulum	78	6.10	ko04141
3	Phenylpropanoid biosynthesis	59	4.62	ko00940
4	Biosynthesis of secondary metabolites	232	18.15	ko01110
5	Cyanoamino acid metabolism	30	2.35	ko00460
6	Starch and sucrose metabolism	61	4.77	ko00500
7	Carotenoid biosynthesis	28	2.19	ko00906
8	alpha-Linolenic acid metabolism	17	1.33	ko00592
9	Plant hormone signal transduction	104	8.14	ko04075
10	Linoleic acid metabolism	8	0.63	ko00591
11	Other glycan degradation	19	1.49	ko00511
12	Metabolic pathways	339	26.53	ko01100
13	Flavonoid biosynthesis	31	2.43	ko00941
14	Cutin, suberine and wax biosynthesis	15	1.17	ko00073
15	Brassinosteroid biosynthesis	10	0.78	ko00905
16	Galactose metabolism	21	1.64	ko00052
17	Zeatin biosynthesis	23	1.80	ko00908
18	Monoterpenoid biosynthesis	6	0.47	ko00902
19	Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	10	0.78	ko00130
20	Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis	7	0.55	ko00909
21	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	9	0.70	ko01040
22	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	14	1.10	ko00630
23	Phenylalanine metabolism	14	1.10	ko00360
24	Stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis	25	1.96	ko00945
25	Vitamin B6 metabolism	5	0.39	ko00750

注: 1~23 通路为显著富集通路($P < 0.05$)。

2.4 地黄叶片中响应遮阴处理关键分子事件

2.4.1 遮阴处理干扰了光合通路关键基因的表达

分析遮阴后地黄叶片中参与光合作用相关基因表达情况,发现参与光合通路(Photosynthesis)的 11 个基因均在遮阴后下调表达(见表 4)。这些基因主要包括光系统 I 的 P700 叶绿体 a 脱辅基蛋白 A2 基因 *psaA* 和亚基Ⅷ基因 *psaI*, 光系统 II 的反应中心 D1 蛋白基因 *PsbA* 和 13 kDa 蛋白基因 *Psb28*, 细胞色素 b6/f 复合体的脱细胞色素 f 基因 *petA*, 以及 F-ATP 酶 α 基因、 β 基因和 a 亚基基因。

2.4.2 遮阴处理影响了叶片中关键激素代谢和关键信号通路 在遮阴地黄叶片差异基因富集的 KEGG 信号通路中,植物激素信号通路显著被富集(见

表 5)。鉴定出生长素信号通路中 *AUX1* 基因、*AUX/IAA* 蛋白基因、生长素响应蛋白 *ARF* 基因和生长素应答 *GH3* 基因等 17 个多数差异表达的基因,在遮阴后的地黄叶片中 14 个基因上调表达,仅有 3 个下调表达。在细胞分裂素信号通路中,细胞分裂素受体蛋白基因 *CRE1*、B 型 *ARR* 蛋白基因上调表达,A 型 *ARR* 蛋白基因下调表达,说明遮阴后叶片细胞的分化受了影响。在赤霉素信号通路中,有 10 个 *DELLA* 蛋白基因均呈下调表达。乙烯信号通路中,1 个乙烯受体蛋白基因 *ETR* 下调表达,而 5 个苏氨酸蛋白激酶基因 *CTR1* 均呈上调表达。这些结果表明遮阴处理改变了叶片内关键激素信号系统调节功能,这种变化更多的体现了叶片在弱光环境下适应性调节变化。

表 4 RNA-Seq 分析鉴定的光合系统相关的差异表达基因

转录本	转录本长度/bp	CK 表达量 (FPKM)	遮阴 (FPKM)	$\log_2$ (遮阴/CK)	上调/下调	基因名称
Unigene16087	3778	5.7	2.76	-1.05	下调	光系统 II 反应中心 D1 蛋白基因
CL7498. Contig2	11 156	6.21	2.62	-1.25	下调	细胞色素 f
Unigene17340	977	102.94	44.56	-1.21	下调	光系统 II 13 kDa 蛋白基因
Unigene11529	10 750	760.45	218.34	-1.80	下调	光系统 I P700 叶绿体 a 脱辅基蛋白 A2 基因
Unigene1327	512	8.36	2.04	-2.04	下调	光系统 I 亚基Ⅷ
CL4982. Contig2	8693	16.00	6.12	-1.39	下调	F-ATP 亚基 β
Unigene117	1567	7.68	3.58	-1.10	下调	F-ATP 亚基 α
CL4764. Contig2	3991	5.16	2.12	-1.28	下调	F-ATP 亚基 a
Unigene2112	290	27.94	65.62	1.23	上调	光捕获复合物 II 叶绿素 a/b 结合蛋白 1 基因
CL5443. Contig1	1272	551.74	226.98	-1.28	下调	光捕获复合物 II 叶绿素 a/b 结合蛋白 12 基因
CL1398. Contig1	1045	30.46	9.11	-1.74	下调	光捕获复合物 II 叶绿素 a/b 结合蛋白 17 基因

注:表中均为显著表达基因($P < 0.001$, FDR < 0.001)。下同。

表 5 RNA-Seq 分析鉴定的激素调控相关的差异表达基因

转录本	转录本长度/bp	CK 表达量 (FPKM)	遮阴 (FPKM)	$\log_2$ (遮阴/CK)	上调/下调	基因名称
CL2375. Contig4	1996	3.36	16.13	2.26	上调	<i>AUX1</i>
CL2375. Contig2	2157	3.92	8.04	1.04	上调	<i>AUX1</i>
Unigene16463	1222	43.09	89.17	1.05	上调	<i>AUX/IAA</i>
Unigene3654	988	35.84	11.21	-1.68	下调	<i>AUX/IAA</i>
Unigene304	1225	19.18	8.83	-1.12	下调	<i>AUX/IAA</i>
CL8926. Contig3	2567	3.56	12.49	1.81	上调	生长素响应蛋白 <i>ARF</i> 基因
Unigene2356	2892	4.16	13.84	1.73	上调	生长素响应蛋白 <i>ARF</i> 基因
CL445. Contig3	3272	0.78	2.55	1.71	上调	生长素响应蛋白 <i>ARF</i> 基因
CL8926. Contig2	3766	5.53	16.09	1.54	上调	生长素响应蛋白 <i>ARF</i> 基因
CL3343. Contig2	2959	1.33	3.44	1.37	上调	生长素响应蛋白 <i>ARF</i> 基因
CL8926. Contig1	2525	1.65	4.23	1.36	上调	生长素响应蛋白 <i>ARF</i> 基因

续表 5

转录本	转录本长度/bp	CK 表达量 (FPKM)	遮阴 (FPKM)	log ₂ (遮阴/CK)	上调/下调	基因名称
Unigene13691	403	6.89	17.47	1.34	上调	生长素响应蛋白 <i>ARF</i> 基因
Unigene905	1339	13.92	32.03	1.20	上调	生长素响应蛋白 <i>ARF</i> 基因
CL3748. Contig2	2894	5.32	10.72	1.01	上调	生长素响应蛋白 <i>ARF</i> 基因
Unigene9557	1436	0.73	3.45	2.25	上调	生长素应答 <i>GHS</i> 基因
Unigene19470	2164	31.77	64.21	1.02	上调	生长素应答 <i>GHS</i> 基因
Unigene11959	2224	47.10	2.05	-4.52	下调	生长素应答 <i>GHS</i> 基因
Unigene21595	1189	1.65	5.37	1.70	上调	细胞分裂素受体 <i>CRE1</i>
CL994. Contig4	2807	1.24	3.48	1.49	上调	<i>ARR-B</i> 蛋白基因
CL3002. Contig2	1435	23.07	10.63	-1.12	下调	<i>ARR-A</i> 蛋白基因
CL1838. Contig2	1458	42.23	9.74	-2.12	下调	<i>DELLA</i> 蛋白基因
Unigene11466	2365	39.64	8.98	-2.14	下调	<i>DELLA</i> 蛋白基因
Unigene7189	2073	180.61	44.58	-2.02	下调	<i>DELLA</i> 蛋白基因
Unigene11464	2331	49.60	12.08	-2.04	下调	<i>DELLA</i> 蛋白基因
CL645. Contig1	2260	34.41	13.44	-1.36	下调	<i>DELLA</i> 蛋白基因
Unigene11467	2309	17.14	7.06	-1.28	下调	<i>DELLA</i> 蛋白基因
CL645. Contig2	2499	27.56	11.16	-1.3	下调	<i>DELLA</i> 蛋白基因
CL2192. Contig1	1053	15.72	6.81	-1.21	下调	<i>DELLA</i> 蛋白基因
CL2192. Contig3	2462	114.65	48.23	-1.25	下调	<i>DELLA</i> 蛋白基因
CL2192. Contig2	811	16.70	8.20	-1.03	下调	<i>DELLA</i> 蛋白基因
CL7040. Contig1	3850	12.81	4.84	-1.40	下调	乙烯受体 <i>ETR</i>
Unigene16116	1645	1.55	7.61	2.30	上调	苏氨酸蛋白激酶 <i>CTR1</i>
Unigene11917	954	3.15	9.15	1.54	上调	苏氨酸蛋白激酶 <i>CTR1</i>
Unigene20268	567	6.12	17.01	1.47	上调	苏氨酸蛋白激酶 <i>CTR1</i>
CL2327. Contig2	2190	1.90	4.76	1.32	上调	苏氨酸蛋白激酶 <i>CTR1</i>
CL3998. Contig3	1986	1.81	4.2	1.22	上调	苏氨酸蛋白激酶 <i>CTR1</i>
CL7383. Contig2	2096	1.66	4.48	1.43	上调	茉莉酸氨基酸缀合酶 <i>JAR1</i>
Unigene14115	2370	2.78	6.54	1.23	上调	<i>NPR1</i>

2.4.3 遮阴处理抑制了梓醇和毛蕊花糖苷合成通路 关键催化酶基因的表达 梓醇和毛蕊花糖苷是地黄植株中标志性药用活性成分,为了解析遮阴对地黄叶片中 2 种关键药用活性成分的影响,对遮阴处理下梓醇和毛蕊花糖苷代谢通路中关键催化酶基因的表达变化进行了详细分析。结果发现鉴定出 12 个差异表达的催化酶基因涉及梓醇合成,其中 11 个下调表达,仅有 1 个基因上调表达(见表 6)。在下调表达的关键基因中,包括 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶(DXS)、4-羟基-3-甲基-2-丁烯基焦磷酸还原酶(HDR)和异戊二烯基二磷酸 δ -异构酶(IPI)等萜类成分合成的骨干催化酶。此外,梓醇合成通路中的关键酶异戊二烯合酶(GES)、8-羟基香叶醇脱氢酶

(10HGO)和鲨烯单加氧酶(SQM)在遮阴也呈现显著下调。这些与梓醇、毛蕊花糖苷合成密切相关催化酶基因的下调表达,暗示着遮阴对萜类成分的积累可能具有明显的抑制作用。

对毛蕊花糖苷合成通路中的关键催化酶基因在遮阴后的表达变化进行分析,发现有 10 个基因出现显著差异表达(见表 7)。其中,2 个苯丙氨酸解氨酶基因 *PAL* 在遮阴后显著上调表达,5 个 4-香豆素-CoA 连接酶基因 *4CL* 中有 4 个则在遮阴后下调表达。在酪氨酸途径中,有 3 个多酚氧化酶 *PPO* 基因,2 个在遮阴后上调表达,1 个下调表达。这些下调表达的关键催化酶基因可能在地黄毛蕊花糖苷的合成和积累中起着重要作用。

表6 通过 RNA-seq 分析鉴定到的参与梓醇合成的差异表达基因

转录本	转录本长度/bp	CK 表达量 (FPKM)	遮阴 (FPKM)	log ₂ (遮阴/CK)	上调/下调	基因名称
CL8481. Contig2	2543	48.06	10.82	-2.15	下调	1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶基因
CL1132. Contig4	1763	86.78	41.11	-1.08	下调	4-羟基-3-甲基-2-丁烯基焦磷酸还原酶基因
CL1132. Contig5	213	50.53	23.87	-1.08	下调	4-羟基-3-甲基-2-丁烯基焦磷酸还原酶基因
Unigene6930	1335	30.52	11.72	-1.38	下调	异戊二烯基二磷酸 δ -异构酶基因
CL2815. Contig1	1982	533.59	229.78	-1.22	下调	异戊二烯合酶基因
CL2815. Contig2	969	203.64	95.91	-1.09	下调	异戊二烯合酶基因
CL379. Contig6	1604	8.37	18.69	1.16	上调	8-羟基香叶醇脱氢酶基因
CL379. Contig1	1598	753.94	188.99	-2.00	下调	8-羟基香叶醇脱氢酶基因
CL2602. Contig3	616	45.47	16.93	-1.43	下调	8-羟基香叶醇脱氢酶基因
CL2602. Contig1	1274	55.60	20.77	-1.42	下调	8-羟基香叶醇脱氢酶基因
CL2602. Contig4	1685	117.31	44.87	-1.39	下调	8-羟基香叶醇脱氢酶基因
CL4931. Contig2	1920	2.65	0.68	-1.97	下调	鲨烯单加氧酶基因

表7 通过 RNA-seq 分析鉴定到的参与毛蕊花糖苷合成的差异表达基因

转录本	转录本长度/bp	CK 表达量 (FPKM)	遮阴 (FPKM)	log ₂ (遮阴/CK)	上调/下调	基因名称
CL2029. Contig3	479	0.00	13.06	13.67	上调	多酚氧化酶基因
CL2029. Contig5	2032	1.20	41.63	5.12	上调	多酚氧化酶基因
CL3216. Contig1	2149	201.74	99.84	-1.01	下调	多酚氧化酶基因
CL1389. Contig4	2539	50.64	124.70	1.30	上调	苯丙氨酸解氨酶基因
Unigene11580	297	26.50	65.39	1.30	上调	苯丙氨酸解氨酶基因
Unigene18693	2035	4.49	47.08	3.39	上调	4-香豆素-CoA 连接酶基因
CL929. Contig3	1927	1.68	0.27	-2.64	下调	4-香豆素-CoA 连接酶基因
CL929. Contig1	1821	8.77	2.22	-1.98	下调	4-香豆素-CoA 连接酶基因
CL929. Contig4	1958	13.00	4.59	-1.50	下调	4-香豆素-CoA 连接酶基因
CL929. Contig5	1901	9.80	3.84	-1.35	下调	4-香豆素-CoA 连接酶基因

3 讨论

光照强度主要通过光周期、光强(光密度)和光质影响药用植物的生长发育进程和活性成分合成。如:许翔鸿等^[5]在延胡索栽培中发现适当遮荫可显著提高其生物碱含量;向红等^[6]发现不同光照强度显著影响当归产量及阿魏酸含量。因此,在药用植物栽培生产中,需根据药用植物典型的需光特性,人为配置合适光照强度(光配方)以提高其产量和药用品质。如:典型的喜阴药用植物三七,适当遮荫是其生产中必须考虑栽培措施^[7];金线莲是典型的林下阴生药用植物,生产中需要选择具有合适郁闭度的林下环境种植^[8]。喜光植物具有较高的光饱和点,全生育期都需要充足的光照,若生长季节中光

照不足,则会使植物生长发育受到不同程度的影响。如:光照强度不足会降低高山红景天根的生物量和红景天苷的含量^[9];在曼陀罗及紫花曼陀罗植株中,随着光照强度的增强,其茎内的花色素苷、类黄酮以及总酚等次生代谢产物的积累量也会相应增加^[10]。耐阴植物的光饱和点较低,在较低的光照强度下即可达到光饱和点,弱光下比强光下生长好。低光照强度有利于石斛株高和可溶性蛋白含量的增加^[11]。光照强度不仅能够显著改变叶片中关键药用活性成分含量,对药用植物叶片形态、生理和解剖结构也有显著的影响^[12]。如:遮阴使芍药的光合能力变差,花鲜质量降低^[13];遮阴会使白三叶的光合速率降低,栅栏组织厚度变小,叶片变薄^[14]。本研究发现,遮阴后地黄的叶片变薄,叶肉细胞海绵组

组织和栅栏组织厚度均降低,叶片数减少,叶片泡状凸起程度变弱甚至消失,说明遮阴严重影响了地黄的叶片生长和分化。但光照是如何调控地黄叶片发育及其内在药用成分合成机制目前并不清晰。

随着高通量测序技术的快速发展,遮阴对植物发育调控的分子机制研究已经受到科研人员的关注。如:在玉米中,通过转录组分析就发现,遮阴能显著影响叶片内光合作用、激素代谢相关基因的表达,其中,光合相关基因表达下调,而生长素、赤霉素代谢相关基因的表达上调,茉莉酸合成相关的基因则表达下降^[15]。本研究中,在遮阴处理地黄叶内所有参与光合的基因均下调表达,说明遮阴下地黄光合能力不足可能是地黄生长不良的主要原因。同时,在遮阴地黄叶片中,与生长素信号转导密切关联的表达基因则显著上调表达,这表明在遮阴处理下地黄通过提高生长素早期应答基因 *AUX1*、*AUX/IAA*、*ARF*、*CH3* 的表达来应对遮阴胁迫。*DELLA* 蛋白是赤霉素信号通路的关键调控因子,*DELLA* 下调表达可降低植物对 GA 的敏感性,加速植物茎的伸长^[16-17]。遮阴处理地黄体内 *DELLA* 下调表达,与地黄茎伸长增加变化趋势一致,说明遮阴后通过降低 *DELLA* 的表达降低地黄对 GA 的敏感性。乙烯信号通路中,乙烯受体蛋白基因 *ETR* 下调表达,而 *CTR1* 上调表达,说明地黄通过降低 *ETR* 表达,并提高 *CTR1* 表达来抑制下游的乙烯响应,以提升叶片对遮阴的适应。

叶片除了是重要的光合器官外,也是药用植物次生代谢产物产生和贮藏的重要组织或药用部位,前期的研究已经发现地黄叶片也含量有大量梓醇、毛蕊花糖苷等关键药用活性成分。因此,药用植物叶片为研究光照与药用成分互作机制提供了良好基础材料。光照强度还会影响药用植物次生代谢产物的积累。如:强光有利于喜光药用植物高山红景天景天苷的积累^[9],也有利于曼陀罗茎花色苷、类黄酮及总酚的积累^[10],但不利于耐阴药用植物石斛可溶性蛋白的积累^[11]。遮阴后,葡萄皮中的花色苷含量降低,参与花色苷合成的催化酶基因表达量也显著降低^[18]。梓醇和毛蕊花糖苷在地黄块根和叶片中均有较高的含量,是《中华人民共和国药典》中地黄质量控制的指标性成分。本研究发现参与梓醇生物合成的绝大多数催化酶基因在遮阴后呈下调表达,尤其是催化梓醇合成最后一步反应的鲨烯单加

氧酶基因 *SQM* 表达量下调,与遮阴后梓醇含量下降的变化趋势一致。本课题组前期完善了毛蕊花糖苷生物合成的代谢通路,克隆了部分催化酶基因^[19-20]。这些催化酶基因中有 10 个在遮阴处理后出现显著差异表达,有 4 个 4-香豆素辅酶 A 连接酶基因和 1 个多酚氧化酶基因下调表达,表明遮阴同时也影响了毛蕊花糖苷的代谢,但这种影响作用可能更为复杂。总之,本研究初步揭示了光照可能通过生长素、乙烯等激素响应调控了叶片的耐阴适应性,同时,光照强度影响了梓醇等地黄关键药用成分关键催化酶基因的转录变化,本研究为进一步揭示地黄光照强度响应机制和药用成分合成机制提供了基础数据。

参考文献

- [1] 郭巧生.药用植物栽培学[M].北京:高等教育出版社,2010:28-38.
- [2] 李振陆.植物生产环境[M].北京:中国农业出版社,2006:131-152.
- [3] 张重义,尹文佳,李娟,等.地黄连作的生理生态特性[J].植物生态学报,2010,34(5):547-554.
- [4] 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.
- [5] 许翔鸿,王峥涛,余国蓼.光照对延胡索生长及生物碱积累影响的初步研究[J].中药材,2004,27(11):804-805.
- [6] 向红,李炆,金尧.光照强度对当归产量及阿魏酸含量的影响[J].中兽医医药杂志,2015(2):53-54.
- [7] 匡双便,徐祥增,孟珍贵,等.不同透光率对三七生长特征及根皂苷含量的影响[J].应用与环境生物学报,2015,21(2):279-286.
- [8] 牛欢,谢卓泌,古力,等.林下种植密度和收获期对金线莲产量和品质的影响[J].中国现代中药,2018,20(7):837-841.
- [9] 阎秀峰,王洋,尚辛亥,等.光强和光质对野外栽培高山红景天生物量和红景天甙含量的影响[J].生态学报,2004,24(4):674-679.
- [10] 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.
- [11] 丑敏霞,朱利泉,张玉进,等.光照强度对石斛生长与代谢的影响[J].园艺学报,2000,27(5):380-382.

(下转第 1107 页)

酮 G、桑酮 H、桑辛素的最佳工艺:乙醇体积分数 68%,液料比 14:1,提取温度 74 ℃,提取时间 110 min,该工艺桑酮 G 得率为 7.09 mg·g⁻¹,桑酮 H 得率为 1.74 mg·g⁻¹,桑辛素得率为 1.69 mg·g⁻¹。此外,本研究建立了同时测定桑白皮中桑酮 G、桑酮 H 和桑辛素的高效液相色谱法。本研究可为桑白皮的有效成分提取、质量控制及开发利用提供参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:280.
- [2] CHAN E W C, WONG S K, INOUE T, et al. Phenolic constituents from the root bark of *Morus alba* with emphasis on morusin and its anti-cancer properties[J]. J Chin Phar Sci, 2019, 28(2): 7-19.
- [3] SHAHANA S, NIKALJE A P G. Phytochemistry and bioactivity of *Morus alba* (Mulberry) plant: A comprehensive review[J]. Asi J Pharm Pharmac, 2019, 5(2): 207-217.
- [4] WEI H, ZHU J J, LIU X Q, et al. Review of bioactive compounds from root barks of *Morus* plants (Sang-Bai-Pi) and their pharmacological effects [J]. Cogent Chemistry, 2016, 2(1): 1212320.
- [5] ZAFAR M S, MUHAMMAD F, JAVED I, et al. White mulberry (*Morus alba*): A brief phytochemical and pharmacological evaluations account[J]. Int J Agric Biol, 2013, 15(3): 1560-8530.
- [6] 李莉, 张赛, 何强, 等. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. 实验室研究与探索, 2015, 34(8): 41-45.
- (收稿日期: 2019-09-18 编辑: 王笑辉)
-
- (上接第 1089 页)
- [12] CAI Z Q. Shade delayed flowering and decreased photosynthesis, growth and yield of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*) plants[J]. Ind Crop Prod, 2011, 34(1): 1235-1237.
- [13] ZHAO D Q, HAO Z J, TAO J. Effects of shade on plant growth and flower quality in the herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) [J]. Plant Physiol Bioch, 2012, 61: 187-196.
- [14] 杨文权, 褚继鹏, 寇建村, 等. 遮阴对白三叶叶片解剖结构和光合特性的影响[J]. 草地学报, 2015, 23(3): 653-656.
- [15] 姜玉娥. 玉米幼苗模拟遮阴处理转录组分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2015.
- [16] ZHAO B, LI H T, LI J J, et al. *Brassica napus* DS-3, encoding a *DELLA* protein, negatively regulates stem elongation through gibberellin signaling pathway [J]. Theor Appl Genet, 2017, 130(4): 727-741.
- [17] LI W J, ZHANG J X, SUN H Y, et al. *FveRGA1*, encoding a *DELLA* protein, negatively regulates runner production in *Fragaria vesca* [J]. Planta, 2018, 247(4): 941-951.
- [18] JEONG S T, GOTO-YAMAMOTO N, KOBAYASHI S, et al. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins [J]. Plant Sci, 2004, 167(2): 247-252.
- [19] 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.
- [20] WANG F Q, ZHI J Y, ZHANG Z Y, et al. Transcriptome analysis of salicylic acid treatment in *Rehmannia glutinosa* hairy roots using RNA-seq technique for identification of genes involved in acetoside biosynthesis [J]. Front Plant Sci, 2017(8): 787.

(收稿日期: 2019-08-28 编辑: 戴玮)