

生物学技术在药用植物鉴定中的研究进展

张丹, 王颖莉, 杜晨晖, 裴香萍, 尚彩玲, 詹海仙*
(山西中医药大学 中药与食品工程学院, 山西 晋中 030619)

[摘要] 药用植物种质资源是中医药现代化发展的根基,深入研究药用植物种质资源是培育优良品种、保证中药产量和规范质量的前提条件。传统的鉴别方法从表观出发,受自然环境和人为因素影响较大,鉴定的效率和准确性普遍偏低。分子生物学技术以其易操作、高灵敏度、结果准确等优点,已被广泛用于药用植物种质资源的相关研究中,主要涉及野生与栽培品区分、中药替代品研究、中成药鉴别、优良品种标记育种、遗传多样性研究、遗传图谱建立和组学研究等多个方面。其中组学研究由于分析目的不同分为基因组学、转录组学、代谢组学、蛋白质组学。基因组学又分为结构基因组学、功能基因组学、比较基因组学3个亚领域。真核生物有细胞核和细胞器,因此组学研究还包括叶绿体基因组学、线粒体基因组学、核基因组学、质体基因组学。其中叶绿体基因组结构简单、相对分子质量小、保守性好;而线粒体基因组变异性强且结构复杂;核基因组数据复杂、核内部不含核糖体,导致翻译过程中会有时空差异,即使多次重复地进行试验,试验的结果也具有不确定性。当前药用植物研究涉及的分子生物学技术及组学研究仍有不足的方面,存在较大的发展空间,需要进一步完善和补充。该文依次介绍了细胞学、分子标记、组学研究技术在药用种质资源鉴定中的特点和应用,为后续进行药用植物种质资源的鉴别、开发及利用提供参考依据。

[关键词] 药用植物; 细胞学研究; DNA分子标记; 组学研究

[中图分类号] R284.2;R289;Q7;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)01-0214-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210111

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20201027.1339.001.html>

[网络出版日期] 2020-10-27 14:22

Research Progress of Molecular Biology Techniques in Identification of Medicinal Plants

ZHANG Dan, WANG Ying-li, DU Chen-hui, PEI Xiang-ping, SHANG Cai-ling, ZHAN Hai-xian*
(School of Chinese Medicine and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine,
Jinzhong 030619, China)

[Abstract] Medicinal plant germplasm resources are the foundation of the modern development of traditional Chinese medicine. In-depth study of medicinal plant germplasm resources is a prerequisite for cultivating fine varieties and ensuring the output and standard quality of traditional Chinese medicine (TCM). Traditional identification methods start with appearance and are greatly affected by natural environment and human factors, with a low efficiency and accuracy of identification are generally low molecularin general. Due to such advantages as easy operation, high sensitivity, accurate results, molecular biology technology has been widely used in the related research of relevant studies for medicinal plant germplasm resources due to its advantages of easy operation, high sensitivity, accurate results, etc. It mainly involving the distinction between wild and cultivated products, researchstudy on substitutes of TCM, identification of Chinese patent medicine, good variety marker breeding, genetic diversity researchstudy, genetic map establishment and omics research,

[收稿日期] 20200527(006)

[基金项目] 山西省重点研发计划项目(201903D221053);山西中医药大学博士科研启动基金项目(2020BK05);山西中医药大学科技创新团队项目(2018TD-009)

[第一作者] 张丹, 硕士, 从事中药资源开发与利用, E-mail: 1368546556@qq.com

[通信作者] * 詹海仙, 博士, 副研究员, 从事药用植物资源开发, E-mail: zhan030006@126.com

etcstudy. Among them, omics researchstudy is divided into genomics, transcriptomics, metabolomics, and proteomics due toby different analysis purposes. Genomics is divided into three sub-fields namely structural genomics, functional genomics, and comparative genomics. Eukaryotes Because eukaryotes have nuclei and organelles, so omics researchstudy also includes chloroplast genomics, mitochondrial genomics, nuclear genomics, and plastid genomics. Among them, the chloroplast genome has a simple structure, small molecular weight, and good conservation, while the mitochondrial genome has a strong variability and complex structure, the nuclear genome data isfeatures complex, data and the nucleus contains no ribosomes in nucleus, resulting in spatiotemporal differences in the translation process, even if repeated repeatedly test, the result of and the test is alsoresults remained uncertain, even after repeated tests. The molecular biology technology and omics researchstudy involved in theby current medicinal plant researchstudy still hashave shortcomings, and there iswith a large room for development, which needs and need further improvement and supplementation. This articlepaper successively introduces the characteristics and applications of cytology, molecular markers, and omics researchstudy techniques in the identification of medicinal germplasm resources, providingin order to provide a reference for subsequent identification, development and utilization of medicinal plant germplasm resources.

[Key words] medicinal plants; cytology study; DNA molecular markers; omics study

我国中药资源种类繁多,不同基原和产地的药材其有效成分不尽相同,研究发现同一中药往往存在基原混杂以及近缘品种较多、易混淆的情况^[1-3],因此,对中药种质资源进行准确鉴定显得尤为重要。传统的研究主要通过表观和显微技术相结合进行鉴定,存在依靠经验且鉴定结果不准确的缺点。随着分子生物学技术的发展,国内外学者将该技术应用于药用植物野生与栽培品种的区分^[4]、中药替代品研究^[5-6]、中成药鉴别^[7-8]、优良品种标记育种^[9-11]、遗传多样性研究^[12-15]、遗传图谱建立^[16-17]、活性成分追踪^[18]、中药体内代谢分析^[19-20]等方面,并取得了大量的成果。基于分子生物学技术对药用植物种质资源进行研究推动了我国中医药事业发展,是实现中药材生产现代化的重要举措。尤其在分子标记及组学技术方面,随着豆科植物的赤豆、红花苜蓿和甘草,兰科的铁皮石斛,唇形科植物的丹参和薄荷,禾本科的黑麦草,旋花科的牵牛花和菟丝子^[21],五加科的三七和人参,浮萍科植物的浮萍,银杏科植物的银杏,鼠李科植物的红枣,薯蓣科植物的山药等物种的基因组序列相继公布,基于基因组或者转录组信息开发性状连锁标记、挖掘相关代谢通路和调控基因方面均取得大量成果^[22-25]。本课题组利用甘草全基因组序列设计开发出大量的分子标记,经研究发现大多数可用于甘草种质资源鉴定^[26]。综上所述,这些分子生物学技术为中药种质资源鉴定、分析及利用提供了技术支持。

本文从细胞学、分子标记、组学及指纹图谱等

方面对中药资源鉴定和分析进行了概括和总结,分析了各技术的优点和缺点,以期对药用植物种质鉴定及野生资源保护提供参考。

1 细胞学

细胞学是研究植物细胞的形态、结构和功能以及与生长、分化、进化等内容的学科,对药用植物的资源鉴定、遗传发育、功效和活性成分的鉴定及研究,均起到微观指导作用。ZHAO等^[27]从染色体基数、核型、叶序及地理位置将黄精属植物分为3大类群。严福林等^[28]对7种淫羊藿进行核型分析和细胞分类学研究,将水城淫羊藿和腺毛、保靖、拟巫山、天全淫羊藿5个种从细胞学水平进行了区分。刘波等^[29]利用去壁低渗法(BSG)对不同地区、居群的半夏样品进行细胞学研究,验证了之前半夏属中 $X=7, 8, 9, 13, 10, 23$ 这6个染色体基数报道,并且首次发现半夏属还存在染色体数目 $2n=36, 42$ 的居群,表明半夏在属内、种间、种内表现出较高的遗传多样性。

细胞学分析主要对药用植物种质的染色体基数、核型等进行分析,从表观到内部、从微观染色体方面诠释药用植物内在根本区别,对物种起源、种间亲缘关系、同科异属植物的鉴定均起到了重要作用。

2 分子标记技术及其分类

分子标记是从形态标记、细胞标记和生化标记发展而来的,具有准确、可靠、高效率鉴定种质资源的优点。随着分子生物学技术的发展,分子标记技术经历了4个阶段并随之产生了多种类型的标记。

2.1 限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP) 限制性片段长度多态性是依据序列差异并产生特定的限制性内切酶酶切位点,从而导致酶切片段长度的变化或片段数量的增减,进行鉴定。其优点为探针可随机选取、稳定、标记多为共显性、能区分杂合和纯合、重复性好、分析简单。缺点为DNA样品量大、费时费力费用高、不适于居群遗传分析。

刘香香等^[30]设计川贝母特异性扩增引物分析了正品川贝母内转录间隔区1(ITS1)序列的特点,比较伪品的序列差异,通过2015年版《中国药典》收录的聚合酶链式反应(PCR)-RFLP法验证正品可扩增出1条200 bp左右的条带,伪品未出现该条扩增条带表明PCR-RFLP技术可快速鉴别正伪川贝母。张文娟等^[31]对50家实验室运用PCR-RFLP法鉴别川贝母进行差异化分析。结果表明,达标占52%,不达标占48%。表明了PCR-RFLP法鉴别川贝母总体满意率偏低,川贝母PCR-RFLP法鉴别检验项目的整体技术水平有待提高。但该方法在中药材真伪鉴定中也发挥了一定的作用。

2.2 随机扩增引物多态性DNA(random amplified polymorphism DNA, RAPD) RAPD标记能反映群体或物种之间基因组的微小差异,具有易操作、不使用同位素,无需目的基因序列的优点,常用于药用植物种内、种间系统学研究。朱学鑫等^[32]对不同产地的白及开展RAPD技术分析,通过聚类分析得到遗传关系树状图。刘丽等^[33]采用RAPD技术得出人参和西洋参的种间亲缘关系最近,与三七较远。苑鹤等^[34]利用RAPD标记对浙江义乌、天台等地的14个居群的铁皮石斛和1个居群的紫皮石斛进行多样性分析,结果表明全国主产区栽培铁皮石斛遗传多样性丰富,且亲缘关系与地理种源具有显著的相关性。该标记的缺点为重复性较差,无法区分杂合和纯合,目前已较少用于种质资源和中药材鉴定。

2.3 扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP) AFLP具有RFLP和PCR共同的优点,稳定性强、重复性高的特点。杜春华等^[12]对短柄乌头遗传多样性进行AFLP分析,物种居群间的多态位点百分率为80.57%,在居群内的多态位点百分率为12%,说明短柄乌头在居群间的遗传多样性高且存在明显的遗传分化,居群内的多样性低。燕丽萍等^[35]利用荧光AFLP分子标记技术采用8对Pst I/Mse I引物组合对90个白蜡种质进

行DNA遗传分析,对白蜡属植物进行研究,结果表明平均多态位点百分率为85.8%,表明白蜡属种间具有丰富的遗传多样性,通过聚类分析研究表明聚类结果与传统分类结果相似度高。谢福春等^[36]采用AFLP标记技术对国内主要产区26份海州常山进行遗传分析,从AFLP引物中筛选扩增条带清晰、多态性高的引物组合进行研究,多态性比例高达98.85%,结合POPGENE软件分析,将26份海州常山分为7大类,聚类结果与地理分布基本趋同,表明了海州常山具有丰富遗传多样性,为后续海州常山开发和保护提供了依据。但是由于该方法对DNA纯度和内切酶质量要求较高,使用方面存在较大的局限性。

2.4 简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)

SSR又称微卫星,是一类由几个核苷酸为重复单位组成的长达几十个核苷酸的串联重复序列。具有高度重复性、多等位基因性质,高稳定性,高丰度,共同优势遗传和良好的基因组覆盖,可以鉴别杂合和纯合、效率高,植物品种鉴定的优先选择。闫国跃等^[37]对苦玄参的主要药效物质通过Q-Q图检验,呈现正态分布,与SSR分子标记进行相关分析,并对其关联位点进行预测,预测与相关分析结果一致,所分析的标记均与2个性状具有显著相关。朱巧等^[38]通过SSR标记将黄精属植物聚类为4大类,其中大部分具有亲缘关系。邵文豪等^[39]应用SSR荧光标记对甘肃武都的113份油橄榄品种进行鉴别,将PCR扩增测序结果与油橄榄品种SSR共享数据库WOGBC和OD进行比对,鉴别油橄榄品种资源。结果表明相同品种同一SSR位点等位基因数值在两个数据库中存在差异。确定可信对照,对113份油橄榄样品SSR荧光检测数据与上述两种数据库进行对比,鉴别出油橄榄品种26个,成功率为23.0%,说明该法鉴定结果准确、可靠,但还需研究新的鉴别方法。许岳军等^[40]基于苎麻转录组测序的SSR序列分析及EST-SSR标记开发,随机挑选1 214对EST-SSR引物对表型性状差异较大的8份苎麻样品进行PCR扩增及电泳检测,将8份种质分为3类。詹海仙等^[26]利用甘草全基因组序列设计开发出大量的SSR标记,经验证多数标记可用于甘草种质资源鉴定。这些标记的大量开发为药用植物遗传分析、图谱构建、分子标记育种等研究奠定了基础。

2.5 表达序列标签微卫星(expressed sequence tags, EST-SSR) 基于表达序列标签开发的微卫星

分子标记,结合了SSR标记和EST技术的优点,闫国跃等^[41]利用EST-SSR引物发现18个苦玄参种群的遗传分化水平不同且杂合度差异较大,亲缘关系受地理隔离影响大。邓绍勇等^[13]应用EST-SSR标记对野生栀子群体进行遗传多样性研究,结论为野生栀子具有较高遗传多样性。袁灿等^[14]基于EST-SSR引物对川芎进行多样性研究,明确川芎资源分为两大类并且表现出一定的地域性。贺润丽等^[15]研究发现大豆的EST-SSR标记在黄芪中的通用性高,而大豆的SSR标记可用于不同来源黄芪的遗传多样性分析。该方法的缺点是所需DNA样品的量较大,灵敏度不高,费时费力,工作量大。

2.6 单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) SNP为第三代DNA标记,可以精确到单个核苷酸的识别,通过DNA序列间的细微差异区分不同个体,较之SSR多态性更高,可获得更加精确的DNA片段序列信息,对DNA严重降解的供试材料也同样适用。本方法具有通量大、多态性丰富、分析速度快、易建立标准化操作,但其缺点为成本高、需要所测物种的全部基因组序列。沈奇等^[10]通过SNPs标记对紫苏新品种进行鉴定,最终选育出具有叶籽两用、丰产、高抗、耐瘠等特性的优良品种。LI等^[11]通过SNP标记对枇杷品种进行分析,从而为枇杷的品种鉴定、多样性分析和优质育种提供了依据。WU等^[42]利用高分辨率溶解曲线技术应用于银杏的SNP基因分型,为银杏遗传和基因组研究提供了的有用资源。

2.7 竞争性等位基因特异性PCR (kompetitive allele specific PCR, KASP) KASP方法利用通用荧光探针,通过touch-down PCR的方法实现SNP分型。含有SNP的单位基因-1和-2作模板;针对等位基因SNP位点设计2个正向引物和1个通用反向引物;每条正向引物尾部有特异性序列,与荧光标记结合。不同颜色荧光反映的是不同SNP类型,使用酶标仪对实验结果进行检测。优点是单步基因分型技术、灵活、便宜、高效。KASP检测方法目前仅应用于作物种质纯度鉴定、基因定位和分子标记辅助育种,在药用植物方面的应用还处于空白状态,主要由于缺乏对药用种质靶SNP和InDel变异位点了解,从而限制了KASP技术的发展。近年来随着生物技术的不断发展,该方法未来将在药用植物种质鉴定方面发挥作用。

2.8 DNA条形码及指纹图谱 DNA条形码是通过利用一段短的、标准DNA序列进行物种鉴定的分子

技术。其优点是操作简单、能快速准确鉴别大量样本、结果不受外界环境影响。刘金欣等^[43]收集黄芩药材的内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列构建数据库,分析得出黄芩的种内序列变异小于种间,结果表明黄芩ITS2条形码数据库稳定可靠,满足黄芩种子DNA条形码鉴定的需求。尽管DNA条形码技术在中药鉴定中发挥了较大作用,但是由于适用于所有物种的通用条形码序列缺乏,在一定程度上限制了该方法的发展。朱晓燕等^[44]通过植物通用DNA条形码分析2种不同性状白茅根的多个位点差异,利用ITS1,ITS2序列和ITS2序列上的关键差异位点分别鉴别了2种不同性状白茅根。HAN等^[45]利用DNA条形码技术对中药市场的药材进行真伪鉴别,发现在1260份样品中有4.2%造假,集中在人参、柴胡、五加皮、金银花等需求较大的中药。LEE等^[46]研究马来西亚的沉香品种,发现[4]对14个不同产地连翘采用RAPD标记进行遗传多样性分析并构建DNA指纹图谱并结合聚类分析,结果表明连翘遗传多样性与产地具有显著相关性。王珊珊等^[16]利用SSR标记,通过电泳法检测PCR产物,建立悬钩子属种质资源DNA指纹图谱并开展其遗传分析。将该种质分为2大类。说明DNA指纹图谱的构建和多样性分析,为该药用植物的鉴定和开发提供参考。

根据2.1~2.8项下不同分子生物学技术的原理、优点、缺点进行系统明了的对比总结,见表1。

3 组学研究

组学研究按照分析目标的不同分为基因组学、转录组学、代谢组学、蛋白质组学。

3.1 基因组学 基因组学分为结构基因组学、功能基因组学、比较基因组学3个亚领域。LIU等^[47]研究药食同源的猕猴桃属植物,并用系统基因组学方法研究发现了大约10个关键进化物种,为该属植物优良品种的选取和育种提供了技术支持。陈璇等^[48]应用全基因组测序技术对野生和栽培大麻进行研究,通过参考基因组的对比,SNP位点检测。

表1 不同分子标记技术的比较

Table 1 Comparison of different molecular labeling techniques

分子标记	原理	优点	缺点
RFLP	酶切片段多态性	探针可随机选取、稳定、标记多为共显性、能区分杂合和纯合、重复性好、分析简单	DNA样品量大、费时费力费用高、对DNA多态检出灵敏度不适于居群遗传分析
RAPD	DNA扩增多态性	易操作、不使用同位素,无需目的基因序列、DNA样品量小	条带不稳定、重复性较差,无法区分杂合和纯合
AFLP	扩增片段长度多态性	稳定性强、重复性高的特点	对DNA纯度和内切酶质量要求较高
SSR	简单重复序列扩增多态性	高度重复性、多等位基因性质,高稳定性,高丰度,共同优势遗传和良好的基因组覆盖,可以鉴别杂合和纯合、效率高,植物品种鉴定的优先选择	具有专一性,扩增条件不同,引物设计困难,费时耗力
EST-SSR	表达序列标签微卫星多态性	结合了SSR标记和EST技术的优点,物种间可转移性、较为准确地表达基因组功能信息	所需DNA样品的量较大,灵敏度不高,费时费力,工作量大
SNP	单核苷酸多态性	通量大、多态性丰富、分析速度快、易建立标准化操作	成本高、需要所测物种的全部基因组序列
KASP	竞争性等位基因特异性PCR	单步基因分型技术、灵活、便宜、高效,KASP检测方法目前仅应用于作物种质纯度鉴定、基因定位和分子标记辅助育种	在药用植物方面的应用还处于空白状态主要由于药用材质缺乏对靶SNP和InDel变异位点了解,从而限制了KASP技术的发展
DNA条形码	DNA片段特异性及多样性	操作简单、快速准确鉴别大量样本、结果不受外界环境影响	没有适用于所有物种的通用条形码序列
DNA指纹图谱	DNA的多态性	具有高度特异性、灵敏度高、结果准确可靠、结果重复性好	药材提取分离到分析检测过程中的标准化、规范化程度不够,对大量信息的化学计量处理方法不完善

结果表明,二者的杂合度和二等位多态性SNP占多态性SNP总数量均有差异,说明了野生和栽培品种在基因水平上的差异。为构建遗传分类和开发分子标记奠定了基础。杨俏俏^[49]对我国西北地区4种肉苁蓉属植物进行叶绿体全基因组测序,得出了其叶绿体基因组结构、大小、相似性、共有基因、分子钟研究,为肉苁蓉鉴定提供了有力证据。张笑^[50]在已知绞股蓝属植物的叶绿体全基因组、核基因组分型GBS和形态学的基础上进行绞股蓝属种间研究。结果表明,叶绿体基因组大小为157.576 bp和139个功能基因,为后续研究作了基础;对绞股蓝属的8个物种进行叶绿体全基因的比较,具有经典的4部分结构,即1个大单拷贝区(LSC),1个小单拷贝区(SSC),2个序列相同方向相反的重复区(IRa和IRb);绞股蓝属分为2个亚属与形态学结果一致;从基因水平研究,遗传变异主要存在于居群间。

目前,已有许多药用植物公布了全基因组序列。目前已公布基因组序列的药用植物包括豆科植物蒺藜苜蓿(500 Mb),赤豆(591,542 Mb),红花苜蓿(420 Mb),甘草(381 Mb);兰科植物铁皮石斛(1.66,1.11 Gb),天麻(1.18 Gb);唇形科植物丹参(641 Mb),薄荷(400 Mb);禾本科植物谷子(400.9,423 Mb),黑麦草(2 Gb);旋花科植物牵牛花(750 Mb),菟丝子^[21](264,83 Mb);五加科植物三七

(2.39 Gb),人参(3.5 Gb);十字花科植物盐芥(260 Mb);卷柏科植物卷柏(212 Mb);桑科植物印度大麻(534 Mb);亚麻科植物亚麻(373 Mb);棕榈科植物油棕榈(1.8 Gb);睡莲科植物莲(879 Mb);浮萍科植物浮萍(158,481 Mb);胡麻科植物芝麻(274 Mb);大戟科植物木薯(742 Mb);银杏科植物银杏(10.61 Gb);鼠李科植物红枣(351 Mb);薯蓣科植物山药(594 Mb);菊科植物野菊花(3 Gb)^[51]。这些基因组序列的公布,为进一步鉴定、开发和利用上述种质资源鉴定奠定了基础。

真核生物不仅有细胞核,还包括一些细胞器,因此组学研究还包括叶绿体基因组学、线粒体基因组学、核基因组学、质体基因组学,其中叶绿体基因组结构简单、相对分子质量小、保守性好,而线粒体基因组变异性强且结构复杂。左文明等^[52]通过高通量技术对唐古特大黄叶绿体全基因组进行测序,测得其基因组大小为161 054 bp,LSC为86 441 bp,SSC为12 745 bp。选取唐古特大黄在内的同科物种与其他科物种进行系统发育树分析,唐古特大与掌叶大黄亲缘关系最近,但其等位基因具有差异位点,用于高效准确区分近缘物种。杨楚虹等^[53]应用高通量测序技术对相近石韦进行叶绿体基因组测序,再用生物信息法进行迭代组装,注释了131个基因,结论为相近石韦非编码区变异大于

编码区,筛选出5个高变异区作为石韦鉴定的候选DNA条形码,相近石韦叶绿体基因组研究为其余属石韦的研究奠定了基础。综上所述,尽管测序技术发展迅猛,但由于核基因组数据庞大且复杂,同时基因组拼接对研究人员的生物信息背景要求也比较高,目前公布全基因组序列信息的物种仍然有限。

3.2 转录组学 转录组学是指在整体水平上研究细胞中基因转录的情况及转录调控规律的学科,在新基因的发掘,SNP及分子标记的挖掘、基因家族鉴定及进化分析、转录图谱绘制、代谢途径确定等方面具有优越性。CHOUDHRI等^[54]对芦荟根和叶进行转录组测序,得到了141 310个Unigenes,筛选出皂苷、木质素、蒽醌和类胡萝卜素等次生代谢产物生物合成有关的基因。WANG等^[55]对黄精进行转录组测序,筛选到138个Unigenes,其中编码了20种与黄精多糖生物合成的相关的酶。黄琼林^[18]对高良姜采取转录组测序进行分析高良姜叶、茎和根茎组织表达差异,结果表明根茎表达量大于叶,即在高良姜萜类合成中根茎活跃于在叶。华桦等^[56]对川产和其他产区花椒果实进行转录组分析得出不同产地样本具有显著差异,通过京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析表明,川产与其他产区的花椒果实及叶片中有明显差异,从而为不同产地花椒的鉴别提供了数据分析。此外,白及^[57]、紫斑牡丹^[58]、金铁锁^[59]、鱼腥草^[60]、夏枯草^[61]、穿心莲^[62]、三七^[63]等物种均进行了转录组研究。但是,该方法的缺点为只提供转录本的信息,不能对转录后调控、修饰等过程进行定量、整体的研究。

3.3 代谢组学 代谢组学是对某种条件下细胞、组织、生物机体全部代谢轮廓的研究,包括核磁共振、液相色谱法、气相色谱法、高效液相色谱和质谱法等单分析技术及LC-MS和GC-MS等多分析技术。文旺等^[64]运用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS^E)和主成分分析(PCA),偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)方法,对不同炮制品甘草饮片、清炒甘草、蜜炙甘草的标志物进行研究,结果表明,在清炒甘草中异甘草苷和单葡萄糖醛酸甘草次酸含量最高;而蜜炙甘草中甘草苷含量最低。为甘草不同炮制品的质量标准物和药效研究提供了基础。赵光跃等^[65]采用核磁共振氢谱(¹H-NMR)植物代谢组学技术对青海和其他地区的枸杞子研究且结合多元统计分析表明了其化学成分相似,无显著差别;相似度表明其代谢物蔗糖、葡萄糖、脯氨酸等有显著差异外,其余代谢物枸杞多糖等无显著

差异。结果表明从枸杞主要成分枸杞多糖进行评价,说明了青海与其他地区枸杞子的化学差异较小,可以将此谱图作为枸杞子的质量评价标准,为其优良育种提供数据支撑。邵坚等^[66]采用UPLC-LTQ-Qrbitrap代谢组学技术对不同产地化学成分进行定性鉴别和软件分析其代谢物,湖北利川黄连与四川彭州、北川黄连各有9种差异代谢物,说明存在明显差异,可作为鉴别标准。尽管代谢组学可以从有效成分方面对中药进行鉴定,但由于质谱并不能检测出所有的代谢产物,因此使用范围有限。

3.4 蛋白质组学 蛋白质组学指的是一种基因组所表达的全套蛋白质,包括结构蛋白质组学和功能蛋白质学两个方面。朱玮^[67]利用蛋白质组学技术对金银花蛋白质表达谱、阔叶十大功劳组织特异性、长春花和桑叶的光酶诱导机制开展试验。通过CPLL技术和PEG分级沉淀法对金银花蛋白质表达谱进行研究,鉴定所得的177个蛋白中还包括6个次生代谢相关蛋白,采取组合多肽配体库(CPLL)技术对金银花中低丰度蛋白进行富集、高丰度蛋白进行沉淀去除,为后续金银花生物研究作了铺垫;利用蛋白质组学技术对阔叶十大功劳叶、茎、根3部位总蛋白进行研究分析得出在根部生物碱含量最高,通过对3部位蛋白比较得到根的蛋白丰度显著高于叶和茎,且该研究首次在蛋白水平上提出了十大功劳不同部位的活性成分量的差异;利用蛋白质组学技术对长春花光酶诱导机制开展研究,发现经光酶诱导后其叶片中吲哚类生物碱含量显著增加,结合实时荧光定量PCR技术对诱导期间叶片进行表达分析试验,结果得出光酶诱导可明显改变长春花植株的光合作用,该研究说明了长春花中生物碱含量增加的机制原理,为后续光酶诱导法的使用打下了基础;利用蛋白质组学技术研究光酶诱导桑叶中Diels-Alder加合物生物合成机制,经过分析得出从桑叶的光诱导中共鉴定出9个化合物,提出了光酶诱导桑叶中Diels-Alder型加合物生物合成机制。周凯凯^[68]对不同树龄的楼观台和黄柏塬银杏叶片开展蛋白质组学研究。其中对楼观台银杏叶得到的差异蛋白点开展MALDI TOF/TOF MS/MS试验,鉴定出30种差异蛋白质,利用<http://www.uniprot.org/>查询注释,划分为8个功能组。黄柏塬运用2-DE图谱中鉴定得到36个显著差异蛋白点并且聚类分析分为4类。

根据3.1~3.4项下组学技术的优点、缺点进行系统明了的对比总结,见表2。

表2 不同组学研究方法的比较

Table 2 Comparison of different omics research methods

组学研究	优点	缺点
基因组学	核基因组数据庞大;叶绿体基因组结构简单、相对分子质量小、保守性好,便于分析研究	核基因组数据复杂,目前只有少数物种具有完整的核基因序列,难以开展系统全面研究;线粒体基因组变异性强且结构复杂;多为预测性结果
转录组学	新基因的发现,SNP及分子标记的挖掘,基因家族鉴定及进化分析,转录图谱绘制,代谢途径确定等方面具有优越性	只提供转录本的信息,不能对转录后调控、修饰等过程进行定量、整体的研究;多为预测性结果
代谢组学	代谢物的种类远少于基因和蛋白数目便于分析;无需进行全基因组测序或建立大量表达序列标签数据库;样品易得可进行动态分析	质谱并不能检测出所有的代谢产物;核磁共振检测的灵敏度不高,只用于分析低丰度代谢产物;多为准确性结果
蛋白质组学	蛋白质组学研究具有高度自动化、高通量、速度快、可在短时间内处理较多数据	蛋白质组学由于受到基因组背景和跨物种蛋白质鉴定技术的限制,目前尚未大规模应用;多为预测性结果

4 总结与展望

随着生物技术手段的更新,分子生物学技术已广泛应用于药用植物种质资源开发、中药鉴定等研究中,并取得了大量的研究成果。细胞生物学对药用植物研究从表观到内部,从微观染色体层面诠释其内在根本区别,但存在一定局限性,通常需与其他分析手段联用。分子标记技术不受自然环境、人为因素、组织部位等影响,具有高效、精准、快速、多态性强等特点,在药用植物种质资源鉴定方面具有独特的竞争优势和应用前景,但仍存在一定的局限性,需随着组学技术的发展进一步的完善和改进。随着组学研究的不断深入,大量药用植物基因组序列和转录本的公布,尤其是代谢组学研究具有结果比较准确、分析方法简便、样品易得、可进行动态研究的优点。同时,由于蛋白质组学受到基因组背景和跨物种蛋白质鉴定技术的限制,目前尚未大规模应用。有学者认为基因组学和蛋白质组学告诉什么可能发生,而代谢组学告知什么确实发生了。随着技术的发展,组学技术的改进与完善,将会更大程度地服务于药用植物相关的研究。指纹图谱由单一局限到通用型气质联用、液质联用、一测多评技术的应用,推动了药用资源的研究发展。因此,药用植物资源鉴定应在组学技术的基础上,结合多种鉴定方法及多学科技术联用,从而达到准确鉴定药用植物种质资源的目的。

[参考文献]

[1] 吕泽芳,于杰. 基于ITS2序列片段的药用植物栝楼及混淆品分子鉴定研究[J]. 西南大学学报:自然科学版,2017,39(9):1-6.
[2] 王璐瑶,万定荣,陈雨洁. 景天属几种药用植物及混淆品的叶表皮比较鉴定[J]. 中华中医药杂志,2012,27(10):2672-2675.

[3] 朱琳,梁勇满,许亮,等. 中药贯众的本草考证及近缘药用植物研究[J]. 中国中医药现代远程教育,2017,15(12):150-153.
[4] 吴婷,魏珊,米丽华,等. 不同产地连翘的DNA指纹图谱构建与聚类分析[J]. 中草药,2016,47(5):816-820.
[5] 张程亮,向东,刘东. 牛黄的现代研究(一):回顾与展望[J]. 医药导报,2017,36(1):1-8.
[6] 肖飞,刘秀兰,李亚洲,等. 濒危中药替代品的现状及替代途径[J]. 医药导报,2014,33(7):973-975.
[7] 王丽,金艳,蒋超,等. 猪胆粉及其中成药的特异性PCR鉴别方法[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(17):136-141.
[8] 王秀芹,林彤,江英桥. 地黄丸类中成药泽泻薄层鉴别方法研究[J]. 中国药品标准,2018,19(2):146-150.
[9] 于福来. 甘草优良种质遴选指标与传粉特性研究[D]. 北京:北京中医药大学,2012.
[10] 沈奇,张栋,孙伟,等. 药用植物DNA标记辅助育种(II)丰产紫苏新品种SNP辅助鉴定及育种研究[J]. 中国中药杂志,2017,42(9):1668-1672.
[11] LI X, XU H, FENG J, et al. Mining of genic SNPs and diversity evaluation of landraces in loquat [J]. Sci Hort, 2015, 195: 82-88.
[12] 杜春华,普春霞,刘小莉,等. 短柄乌头遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 中草药,2018,49(2):439-443.
[13] 邓绍勇,朱培林,温强,等. 基于EST-SSR分子标记的 梔子野生群体遗传多样性研究[J]. 中草药,2018,49(2):431-438.
[14] 袁灿,彭芳,杨泽茂,等. 川芎转录组 SSR 分析与 EST-SSR 标记的开发[J]. 中国中药杂志,2017,42(17):3332-3340.
[15] 贺润丽,樊杰,平莉莉,等. 大豆基因组 SSR 和 EST-SSR 在黄芪中的通用性分析[J]. 分子植物育种,2015,13(5):994-998.

- [16] 王珊珊,耿佳麒,赵晨辉,等. 悬钩子属(*Rubus*. L)种质资源DNA指纹图谱构建及遗传多样性分析[J]. 分子植物育种, 2020, doi: 46.1068.S. 20191210.1524.004.
- [17] 刘天亮,董诚明,齐大明. 基于中药质量标志物(Q-marker)的金银花指纹图谱体系的构建思路[J]. 中草药, 2020, 51(1):229-235.
- [18] 黄琼林. 高良姜转录组差异表达基因分析[J]. 中药材, 2020, 43(3):553-557.
- [19] 刘文欣,冯芳. 基于高分辨质谱的中药体内代谢物鉴别策略[J]. 广州化工, 2020, 48(6):53-55.
- [20] 张霞. 基于液质联用技术的中药黄酮类成分的体内外代谢研究以及鸭跖草化学成分定性定量分析[D]. 石家庄:河北医科大学, 2018.
- [21] SUN G L, XU Y X, LIU H, et al. Large-scale gene losses underlie the genome evolution of parasitic plant *Cuscuta australis*[J]. Nat Commun, 2018, 9(1):2683.
- [22] 王焕君,马致洁,董捷鸣,等. 雷公藤配伍甘草减毒大鼠体内尿液中的小分子代谢物以及相应生物代谢通路[J]. 世界中医药, 2020, 15(8):1102-1107.
- [23] 秦袖平,安雅婷. 色氨酸-犬尿氨酸代谢通路与神经退行性疾病及中医药干预作用的研究进展[J]. 天津中医药, 2019, 36(10):1031-1036.
- [24] 汤琛琛,刘亚敏,石玉琳,等. 中药调控DNA甲基化修饰的研究进展[J]. 中国医药导报, 2017, 14(18):30-33.
- [25] 阚金耀. 基于有丝分裂调控基因MAD2/CDC20研究神类中药对急性髓系白血病细胞作用的机制[D]. 济南:山东中医药大学, 2016.
- [26] 詹海仙,王颖莉,杜晨晖,等. 基于甘草全基因组序列的SSR分子标记开发[J]. 分子植物育种, 2020, doi: 46.1068.s. 20200521.1732.006.
- [27] ZHAO L H, ZHOU S D, HE X J, et al. A cytotoxic analysis of Chinese *Polygonatum* (*Asparagaceae*) species [J]. Nordic J Bot, 2014, 32(4):441-451.
- [28] 严福林,何顺志,徐文芬,等. 七种中国淫羊藿属药用植物细胞分类学研究[J]. 广西植物, 2016, 36(9):1022,1039-1045.
- [29] 刘波,李玉擒,徐安培. 半夏不同居群的细胞学研究[J]. 黑龙江农业科学, 2017(5):110-113.
- [30] 刘香香,李靖,张煜彬,等. PCR法快速鉴别川贝母真伪[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(10):1844-1851.
- [31] 张文娟,赵萌,项新华,等. 川贝母PCR-RFLP法鉴别检验能力验证活动分析[J]. 中国药事, 2020, 34(1):58-62.
- [32] 朱学鑫,陈锐敏,高承贤,等. 不同产地白及遗传多样性的RAPD分析[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(13):1648-1651.
- [33] 刘丽,肖炳焱,聂平,等. 采用RAPD技术对人参属的亲缘关系和鉴别的分析[J]. 药物分析杂志, 2016, 33(2):255-260.
- [34] 苑鹤,林二培,朱波,等. 铁皮石斛人工栽培居群的遗传多样性研究[J]. 中草药, 2011, 42(3):566-569.
- [35] 燕丽萍,吴德军,王因花,等. 白蜡属优良种质资源亲缘关系的AFLP分析[J]. 中南林业科技大学学报, 2018, 38(7):89-95.
- [36] 谢福春,曾现艳,程瑶,等. 26份海州常山种质资源遗传多样性的AFLP分析[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(11):19-23.
- [37] 闫国跃,杨帆,白燕远,等. 69份苦玄参种质SSR遗传多样性及品质性状相关标记分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(4):174-184.
- [38] 朱巧,邓欣,张树冰,等. 黄精属6种植物的SSR遗传差异分析[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(14):2935-2943.
- [39] 邵文豪,王兆山,张建国. SSR荧光标记用于我国油橄榄品种鉴别的评价[J]. 东北林业大学学报, 2019, 47(12):7-15.
- [40] 许岳军,马玉申,董静宇,等. 基于苕麻转录组测序的SSR序列分析及EST-SSR标记开发[J]. 分子植物育种, 2020, doi:46.1068.s. 20190619.1556.002.
- [41] 闫国跃,杨帆,白燕远,等. 苦玄参转录组EST-SSR引物开发及群体遗传多样性分析[J]. 中草药, 2019, 50(1):195-202.
- [42] WU Y, ZHOU Q, HUANG S, et al. SNP development and diversity analysis for *Ginkgo biloba* based on transcriptome sequencing [J]. Trees, 2019, 33(2):587-597.
- [43] 刘金欣,魏妙洁,李耿,等. 黄芩ITS2条形码数据库构建及其种子的DNA条形码鉴定方法建立[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(9):37-45.
- [44] 朱晓燕,黄韵璇,黄昌杰,等. 两种白茅根聚合酶链式反应法-限制性片段长度多态性分析鉴别方法的研究[J]. 中国药学杂志, 2019, 54(18):1486-1490.
- [45] HAN J, PANG X, LIAO B, et al. An authenticity survey of herbal medicines from markets in China using DNA barcoding[J]. Sci Rep, 2016, 6:18723.
- [46] LEE S, NG W, MAHAT M, et al. DNA barcoding of the endangered *Aquilaria* (*Thymelaeaceae*) and its application in species authentication of agarwood products traded in the market[J]. PLoS One, 2016, 11(4):e0154631.
- [47] LIU Y, LI D, ZHANG Q, et al. Rapid radiations of both kiwifruit hybrid lineages and their parents shed light on a two-layer mode of species diversification

- [J]. *New Phytol*, 2017, 215(2): 877-890.
- [48] 陈璇, 郭蓉, 王璐, 等. 基于全基因组重测序的野生型大麻和栽培型大麻的多态性 SNP 分析[J]. *分子植物育种*, 2018, 16(3): 893-897.
- [49] 杨俏俏. 中国肉苁蓉属植物叶绿体全基因组解析、比较基因组及系统发育研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2019.
- [50] 张笑. 绞股蓝属植物系统发育和群体遗传学研究[D]. 西安: 西北大学, 2019.
- [51] LEITCH I J, JOHNSTON E, PELLICER J, et al. Plant DNA C-values database [EB/OL]. <https://cvalues.science.kew.org>.
- [52] 左文明, 曾阳, 杨春芳, 等. 基于高通量技术的唐古特大黄叶绿体全基因组测序及应用研究[J]. *中草药*, 2019, 50(22): 5545-5553.
- [53] 杨楚虹, 崔英贤, 聂丽萍, 等. 相近石韦叶绿体基因组学分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(5): 123-131.
- [54] CHOUDHRI P, RANI M, SANGWAN R, et al. De novo, sequencing, assembly and characterisation of *Aloe vera*, transcriptome and analysis of expression profiles of genes related to saponin and anthraquinone metabolism [J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 427-447.
- [55] WANG S, WANG B, HUA W, et al. De novo assembly and analysis of *Polygonatum sibiricum* transcriptome and identification of genes involved in polysaccharide biosynthesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(9): 1950-1966.
- [56] 华桦, 严志祥, 田韦韦, 等. 川产道地药材花椒转录组及品质相关性探讨[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(4): 732-738.
- [57] 姜福星, 魏丕伟, 魏帼英, 等. 白芨转录组特性分析[J]. *分子植物育种*, 2018, 16(7): 2155-2165.
- [58] 韩平, 阮成江, 丁健, 等. RNA-seq 技术开发紫斑牡丹目的基因 SSR 标记[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(11): 3665-3673.
- [59] 邱芬, 雷瀚, 陈杰, 等. 云贵地区金铁锁 EST-SSR 遗传多样性分析[J]. *中草药*, 2018, 49(16): 3895-3906.
- [60] 黎晓英, 刘胜贵, 王丹, 等. 鱼腥草转录组 SSR 位点信息分析及其多态性研究[J]. *中草药*, 2016, 47(10): 1762-1767.
- [61] 王会敏, 苏秀红, 董诚明, 等. 夏枯草转录组 SSR 位点信息分析[J]. *中国现代中药*, 2018, 20(1): 29-33+38.
- [62] 李俊仁, 陈秀珍, 汤小婷, 等. 穿心莲转录组 SSR 位点信息分析[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(12): 2503-2508.
- [63] LIU M H, YANG B R, CHEUNG W F, et al. Transcriptome analysis of leaves, roots and flowers of *Panax notoginseng* identifies genes involved in ginsenoside and alkaloid biosynthesis [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 265.
- [64] 文旺, 李莉, 李德坤, 等. 基于液质联用技术和植物代谢组学的甘草炮制品化学成分差异性分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(17): 104-110.
- [65] 赵光跃, 魏玉海, 苏姗姗, 等. 基于¹H-NMR 植物代谢组学技术分析青海产区枸杞子的化学特征[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(17): 95-103.
- [66] 邵坚, 吴样明, 李谥光, 等. 基于 UPLC-LTQ-Qorbitrap 代谢组学技术的不同产地黄连组分比较研究[J]. *中药材*, 2020, 43(2): 309-313.
- [67] 朱玮. 基于蛋白质组学的四种药用植物蛋白质表达谱、组织特异性及光酶诱导机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- [68] 周凯凯. 不同树龄银杏叶片差异蛋白研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.

[责任编辑 顾雪竹]