

地黄育种研究进展

周延清, 姚换灵, 周春娥, 段红英, 路淑霞

(河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007)

摘要: 地黄是一种玄参科药用植物, 是我国著名的“四大怀药”之一, 具有重要的药用价值和经济价值。该文综述了地黄的引种、选择育种、杂交育种、组织培养辅助育种、转基因育种和DNA分子标记辅助育种等育种研究的成果, 以期为地黄育种工作者提供参考。

关键词: 地黄; 育种; 中草药

中图分类号: Q792.91 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2010)03-0373-04

Review on *Rehmannia glutinosa* breeding

ZHOU Yan-Qing, YAO Huan-Ling, ZHOU Chun-E,
DUAN Hong-Ying, LU Shu-Xia

(College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: Medicinal plant *Rehmannia glutinosa* (Scrophulariaceae) is one of “the top four Huai herbal medicines” in China, which is possessed of important medicinal and economical values. This review summarized the achievements made so far in the breeding of *R. glutinosa* by introduction, selection, hybridization, tissue culture, gene transformation and DNA marker-assisted breeding in order to provide reference for the breeding researchers of *R. glutinosa*.

Key words: *Rehmannia glutinosa*; breeding; Chinese traditional herbs

地黄 (*Rehmannia glutinosa*) 是一种玄参科 (Scrophulariaceae) 地黄属 (*Rehmannia*) 多年生草本植物。全世界地黄有 6 个种, 主要分布在韩国、日本和中国 (Chung 等, 2006; 李先恩, 2007)。地黄在中国栽培和应用比在其他国家广泛 (Zhang 等, 2007), 为我国大宗常用中药材之一, 广泛分布于辽宁、内蒙古、陕西、山西、河北、河南、山东、江苏、安徽、浙江、湖南、湖北与四川等地区。其块根入药, 分为鲜地黄、生地黄与熟地黄三种类型, 每一种类型的地黄都有不同药效 (Chung 等, 2006; Yu 等, 2006)。传统认为“怀庆地黄”质量优良, 叫做怀地黄。从明朝起, 怀地黄的道地地位就已确立, 其他地区栽培地黄多引自河南怀庆 (现武陟、温县、博爱等县区)。怀地黄

的主要特点是块大、油性大、有菊花心, 至今已有近三千年的栽培历史。地黄含有梓醇、糖类、生物碱、维生素 A, B, C 和 D、多种氨基酸、强心甙及铁、磷等成份 (Liu 等, 2006; Dirk 等, 2007; Chung 等, 2006), 能够补充活力, 增强肝脏、肾脏和心脏的功能, 用于治疗多种疾病如糖尿病、便秘、贫血、泌尿系统的问题、头晕及调节月经流量 (Zhang 等, 2007)。地黄亩产干货在 300~400 kg, 按 4~6 元/kg 的价格计, 每亩效益在 1 200~2 000 元。市场年需求量 2×10^7 kg 以上, 而且近年来有增无减 (于金宝等, 2007)。因此, 地黄已成为产区重要的经济来源之一。要获得优质高产地黄和优厚的经济效益, 就必须要有优良的地黄品种。为得到地黄的优良性状, 人们通过

收稿日期: 2008-11-15 修回日期: 2009-03-23

基金项目: 国家“863”计划项目 (2006AA100109); 河南师范大学大学生创新性实验计划 (2008202) [Supported by the Project of National 863 Plans (2006AA100109); Technology Innovation Fund for College Students of Henan Normal University (2008202)]

作者简介: 周延清 (1963-), 男, 河南邓州市人, 博士, 教授, 主要从事植物细胞工程和 DNA 分子标记研究, (E-mail) yqzhou@htu.cn.

长期的育种实践和留种栽培,积累了大量的地黄农家品种。据不完全统计,地黄的品种名称多达 50 多个(吴志刚等,2007)。本文介绍了地黄品种育种技术研究进展。

1 引种

在植物引种过程中,植物对新的生态环境的反应有两种类型:简单引种和驯化引种。引种的意义主要表现在:引种是栽培植物起源与演化的基础;引种是丰富并改变品种结构,提高生活质量快速而有效的途径,促进农业生产的发展;引种可为各种育种途径提供丰富多彩的种质资源,服务育种事业。地黄栽培区域广泛,各地又有不少优良品种。例如,山西绛县南樊镇在 20 世纪 60 年代初就开始从河南引种地黄(例如温 85-5),至今没有断种,已是山西地黄的一大产区。近几年来,地黄种植不断向周边扩展,规模越来越大。(河南中药材网)。日本的 Matsumoto 等(1989)报道从中国引进赤野地黄,进行地黄脱毒研究。根据观察,一株地黄劣种一年能繁殖出十几株甚至几十株,第二年可发展到几百株,第三年就可发展到数千株。在同一块地里,良种单株产量 200~250 g,而劣种仅产 36~56 g,品种混杂退化后良种比例下降,劣种比例上升。如河南地黄引种至北京,初期良种占 89%,劣种仅占 11%,不进行去杂去劣,经过 3 年以后,良种仅占 5.76%,劣种却上升到 94.24%,每平方米产量由 1.5 kg 下降到 0.7 kg。采取去杂去劣措施的比不采取该措施的增产 3 倍以上(中草药的良种繁育, http://www.agri.com.cn/tech/detail_257554.html)。地黄属于种子植物,引种要遵循种子植物引种理论(曾汉元,2008)。

2 选择育种

选择育种是指直接利用自然变异,不需要人工创造新变异而从中进行选择,并通过比较试验的育种途径。地黄在生产上虽主要用无性繁殖,但由于环境条件的影响,也常会出现一些变异类型。在此基础上进行有目的的选择、培育,亦能获得一些优良品种。王丽华等(1979)报道,地黄品种内存在着各种变异类型,形成 6~8 个栽培品种,其中以小黑英产量最高。

3 杂交育种

杂交育种是选育新品种的主要途径,是近代育种工作最重要的方法。目前,世界各国种植的主要农作物大都是杂交品种,它们获得了大面积增产的效果。转基因等新的生物工程技术现已用于杂交育种,科学家们正在努力为人类培育出更多更好的农作物新品种。地黄品种繁多,又各具特色,并有丰富的野生资源,通过人工有目的的杂交可综合各品种的优良性状,故开展地黄杂交育种是大有前途的。例如,地黄临地 0011 品种是由山西省农业科学院小麦研究所张红芳等(2007)于 2000 年利用温 85 作母本,北京 3 号作父本进行杂交选育而成。其产量较温 85 品种(CK)鲜重增产 11.5%,干重增产 17.4%。1920 年,药农李开寿挖取野地黄原种,与家种地黄杂交,培育出抗涝、抗虫害、产量高的地黄新品种“金状元”(河南中药材网)。20 世纪 70 年代,中国医学科学院药物研究所,用地黄的两个品种新状元和武涉 1 号杂交育成“北京 1 号”;用小黑英和大青英杂交育成“北京 2 号”,每公顷产鲜品 10 500~18 750 kg,高产者为 22 500~30 000 kg,已在京郊大面积推广生产(<http://www.pp57.com/yumiao/72/2008/200801031759.htm>)。85-5 地黄是温县农科所王乾璐以单县 151 为母本,金状元为父本,杂交选育而成的高产优质地黄新品种,每亩产鲜地黄 4 000 kg 左右,最高可达 5 000 kg,比金状元、北京一号分别增产 87%和 134.7%,且块根个大质优,二级以上产品占总产的 50%~70%(重庆蔬菜信息网)。

4 植物组织培养辅助育种技术

与常规的诱变育种方法相比,植物组织培养具有明显的优越性。首先,在组织培养条件下可以反复大批量的在培养瓶中处理植物愈伤组织、丛生芽,提高多倍体诱导成功率;其次,由于组织培养技术不受节气等自然调节的影响,可以大大缩短诱导时间并在短期内快速鉴定出大批量株系,繁殖大量试管苗。植物组织培养育种包括单倍体育种、远缘杂交育种、无性系变异的筛选、脱毒苗的培养与快速繁殖及种质资源的保存和基因库的建立。实践证明,利用组织培养技术进行地黄育种,尤其是抗病育种是

行之有效的。国内,地黄的组织培养始于 1983 年,毛文岳等最先开展了怀地黄茎尖培养的研究。迄今为止,国内外关于地黄组织培养的研究已有大量报道,包括从地黄根茎所获无菌苗组织器官(叶片、茎段和叶柄)、天目地黄幼叶片、新鲜块根、花粉和叶肉的原生质体为外植体进行组织培养而再生植株(薛建平等,2003;陈敏艳等,2004;赵楠等,2007)。例如,山西省农科院棉花研究所植物脱毒中心现有优质脱毒地黄,品种:北京 3 号、温 85-5。茎尖培养的金状元脱毒品种茎尖 16。组培 85-5 和组培 9302。国外,日本的赤野地黄脱毒苗培养体系已经建立和应用于生产实践中(Matsumoto 等,1989;Hatano 等,1997),脱毒地黄的增产幅度为 16.5%~45.5%,平均 31%(张振臣,2004)。

5 转基因育种

转基因育种是作物育种技术的延伸,为育种者提供了两种极好的机会;一是导入现在种质库中不存在的新遗传变异,二是用已知基因产生希望的表现型。转基因对作物改良的潜力已经在近代含有转基因新性状(譬如病虫害抗性和农药耐性)品种以及杂种的商品化方面得到充分证实。转基因技术提供了从分子水平直接进行遗传操作和定向改造植物性状的手段(黄涛,2004),正在成为作物育种必不可少的部分。地黄转基因研究方面有少数的报道。在韩国,Lim 等(2005)用根癌农杆菌介导方法把花生白藜芦醇合酶基因转入地黄,使用 Southern blot 和 Northern blot 和 PCR 扩增证明该基因整合到地黄基因组中,获得表达白藜芦醇合酶而且抗尖孢镰刀菌的转基因地黄植物;在中国,周延清(2005)第一次报道发根农杆菌转化怀地黄获得毛状根克隆,从中提取梓醇,再生转基因植株。同年,Sung(2005)也报道用发根农杆菌 15834 转化地黄,获得毛状根克隆,从其中提取梓醇,但没有报道获得转化植株。周延清(2007)报道发根农杆菌转化怀地黄获得毛状根和转基因植株。同年,张慧等(2007)报道用发根农杆菌感染地黄外植体诱导其产生毛状根,并加以培养,为今后选择合适的培养方式,大规模培养毛状根来生产地黄的次生物质奠定基础。另外,周延清等作者撰写的有关怀地黄遗传转化的文章近期将 Russian Journal of Plant Physiology 上发表。

6 DNA 分子标记辅助选择育种

分子标记辅助选择育种的基本原理是利用与目标基因紧密连锁或表现共分离关系的分子标记对选择个体进行目标区域以及全基因组筛选,从而减少连锁累赘,获得期望的个体,达到提高育种效率的目的。DNA 分子标记技术在地黄研究中的使用始于 Choi(1997)用 RAPD 标记技术评价地黄愈伤组织再生植株的遗传多样性。Hatano(1997)用同样技术诊断茎尖快速繁殖地黄品种和 F1 代杂种。2002~2007 年,又有几位作者用该技术评价地黄品种的遗传多样性(陈京荔等,2002;周延清等,2004a,2006b;吴志刚等,2007)。Yuan 等(2003)用 AFLP 技术分析新加坡市场上销售的地黄和其他几种中草药的异质性。2004~2006 年,利用 ISSR 标记技术评价地黄品种的遗传多样性和亲缘关系(周延清等,2004a,c,2006b,)。闫坤等(2007)报道对地黄属 6 个物种进行的核糖体内转录间隔区 ITS 序列分析结果表明,地黄属为单系起源,祁建军等(2007)使用 RAPD、AFLP 和 rDNA-ITS 标记技术分析地黄种质资源遗传变异(<http://www.niubao.com/nongye/3404.html>)。近年来,王艳等(2008)用 RAPD 和 ISSR 分析野生地黄群落之间遗传差异类型;赵楠等(2009)用 ISSR 分析地黄居群遗传多样性;古风平等(2009)建立了地黄 SRAP 标记体系。目前,作者实验室正在进行 22 个地黄品种的 SRAP 标记分析,以期为地黄的分子标记辅助育种研究奠定基础。

综上所述,地黄育种已选育出的地黄优良品种既保证用药的有效和安全,又提高种植的经济效益。但由于地黄生产多使用营养繁殖,而且多数品种经过多年栽培后品种退化,质量和产量下降严重,因此,对已有的地黄品种应当加以提纯复壮,同时还应在展开地黄种质资源的搜集、鉴定和评价基础上,积极开展地黄优良品种的选育工作,为地黄生产提供优质高产新品种。另外,目前有些企业开发和经营地黄饮片和地黄茶等产品以及地黄花美丽而具很高的观赏价值。所以,今后地黄育种工作应该在药用、食用和观赏三方面进行研发。同时,要正视地黄在世界范围内分布、种植面积和开发应用的有限性使地黄的育种技术还相对落后的现实,尤其是基因工程育种和分子标记辅助选择育种落后的现实(譬如,

地黄的基因工程育种方面,只使用了农杆菌介导的转化方法转入 *T-DNA* 基因和白藜芦醇合酶基因;在 DNA 分子标记辅助选择育种方面,主要集中在基于 DNA 分子标记的遗传多样性和亲缘关系研究以及茎尖快速繁殖地黄品种和 F1 代杂种的鉴定),加强地黄基因工程育种和分子标记辅助选择育种研究,提高地黄育种的科技含量和效率,更好地为地黄研究和生产服务。

参考文献:

- Chen JL(陈京荔), Huang LQ(黄璐琦), Shao AJ(邵爱娟). 2002. RAPD analysis on different varieties of *Rehmannia glutinosa*(地黄不同品种的 RAPD 分析)[J]. *China J Chin Mat Med*(中国中药杂志), **27**(7):505—50
- Chen MY(陈敏艳), Liang ZS(梁宗锁), Wang ZZ(王喆之). 2004. Tissue culture and plantlet regeneration of *Rehmannia glutinosa*(地黄组织培养及植株再生的研究)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报), **24**(6):1 083—1 087
- Choi HS. 1997. Evaluation of genetic diversity of callus-derived plantlets of *Rehmannia glutinosa* using randomly amplified polymorphic DNA(RAPD)[J]. *Agric Develop Res*, **2**:143—147
- Chung IM, Kim JJ, Lim JD, et al. 2006. Comparison of resveratrol, SOD activity, phenolic compounds and free amino acids in *Rehmannia glutinosa* under temperature and water stress[J]. *Environ Exper Bot*, **56**:44—53
- Dirk C, Albach, Li HQ, et al. 2007. Molecular systematics and phytochemistry of *Rehmannia*(Scrophulariaceae)[J]. *Biochem Syst Ecol*, **35**:293—300
- Hatano M, Nakai R, Kawanishi F, et al. 1997. Genetic diagnosis of *Rehmannia* species micropropagated by tip tissue culture and an F1 hybrid by RAPD analysis[J]. *Plant Breeding*, **116**:589—591
- Hou ZG(吴志刚), Wang M(王敏), Huang LQ(黄璐琦), et al. 2007. RAPD analysis on genetic relationship among varieties of *Rehmannia glutinosa*(地黄不同品种遗传关系的 RAPD 分析)[J]. *China J Chin Mat Med*(中国中药杂志), **32**(18):1 865—1 869
- Huang T(黄涛), Li GG(李耿光), Zhang LY(张兰英), et al. 2004. Advances in *Citrus* genetic transformation(柑桔遗传转化技术的研究进展)[J]. *Guihaia*(广西植物), **24**(2):134—138
- Jung DL, Song JY, Li MC, et al. 2005. Resveratrol synthase transgene expression and accumulation of resveratrol glycoside in *Rehmannia glutinosa*[J]. *Molecular Breeding*, **16**:219—233
- Li XE(李先恩), Ji(祁建军), Zhou LL(周丽莉), et al. 2007. Observation and comparison on the shape and biological character for *Rehmannia glutinosa* germplasm(地黄种质资源形态及生物学性状的观察与比较)[J]. *J Plant Gen Res*(植物遗传资源报), **8**(1):95—98
- Liu J, He QJ, Zou W, et al. 2006. Catalpol increases hippocampal neuroplasticity and up-regulates PKC and BDNF in the Aged Rats[J]. *Brain research*, **1123**:68—79
- Park SU, Kim HH, Yu CY, et al. 2002. Agrobacterium-mediated genetic transformation of Chinese foxglove, *Rehmannia glutinosa* [J]. *Biotechnology Letters*, **24**:547—550
- Sung JH. 2005. Growth characteristics and catalpol production in Chinese foxglove(*Rehmannia glutinosa*) hairy roots transformed with *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834[J]. *J Plant Biology*, **44**(4):380—386
- Wang TL(王天亮), Wang QJ(王乾珺). 1999. High-yield cultivation of *Rehmannia glutinosa* "85-5"("85-5"地黄高产栽培)[J]. *Farm brainman*(农家参谋), **3**:10
- Wang LH(王丽华), Tan BJ(谭炳杰), Zhang LS(张连仕). 1979. Investigation of selection and reservation of *Rehmannia glutinosa* in Henan(河南地黄选种及留种方法的调查)[J]. *Pharm Bull*(药学通报), **14**(7):314
- Xue JP(薛建平), Ge DY(葛德燕), Zhang AM(张爱民). 2003. Progress on research of tissue culture of *Rehmannia glutinosa*(地黄组织培养研究进展)[J]. *China J Chin Mat Med*(中国中药杂志), **28**(12):1 114—1 116
- Yu HH, Seo SJ, Kim YH, et al. 2006. Protective effect of *Rehmannia glutinosa* on the cisplatin-induced damage of HEI-OC1 auditory cells through scavenging free radicals[J]. *J Ethnopharmacol*, **107**:383—388
- Yuan MF, Hong Y. 2003. Heterogeneity of Chinese medical herbs in Singapore assessed by fluorescence AFLP analysis[J]. *Amer J Chin Med*, **31**(5):773—779
- Yan K(闫坤), Zhao N(赵楠), Li HQ(李宏庆). 2007. Systematic relationships among *Rehmannia*(Scrophulariaceae) species(地黄属种间亲缘关系研究)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报), **27**(6):1 112—1 120
- Yu JB(于金宝), Yan ZG(颜治国), Wang ZM(王芝民). 2007. Transplantation technique of virus-free *Rehmannia glutinosa* test-tube plantlets(脱毒地黄试管苗移栽技术)[J]. *Scientific Fanning*(科学种养), **11**:12—14
- Zeng HY(曾汉元), Qiu K(邱昆), Zhang QZ(张清政), et al. 2008. Phenophase observation and introduction and cultivation of ornamental ferns(观赏蕨类引种栽培及其物候期的观察)[J]. *Guihaia*(广西植物), **28**(1):86—90