

杨林林, 张涛, 杨利民, 等. 人参叶片中人参皂苷含量、关键酶基因表达和生态因子的相关性分析[J]. 华南农业大学学报, 2018, 39(3): 39-47.

人参叶片中人参皂苷含量、关键酶基因表达和生态因子的相关性分析

杨林林, 张涛, 杨利民, 韩梅
(吉林农业大学 中药材学院, 吉林 长春 130118)

摘要:【目的】明确人参皂苷生物合成的生理生态机制, 揭示生态因子和遗传因素与药材质量的关系。【方法】以 4 年生不同生长时期的人参叶为试验材料, 用 HPLC 法测定人参叶中 8 种单体人参皂苷 (Rg₁、Re、Rf、Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc 和 Rd) 含量; 实时荧光定量 PCR 法测定 7 个参与人参皂苷合成的关键酶基因 (*HMGR*、*FPS*、*SS*、*SE*、*DS*、*β-AS* 和 *CYP716A47*) 的表达量; 通过相关性和灰色关联度分析生态因子和人参皂苷合成关键酶表达对人参叶中皂苷合成和积累的影响。【结果】7 月 13 日—9 月 29 日人参皂苷合成关键酶基因表达活跃, 各个关键酶之间有协同增减的趋势; 人参叶中单体皂苷含量最高的是 Re 和 Rg₁, 在果后参根生长期 (8 月 31 日—9 月 13 日) 分别达到最大值 60.30 和 39.38 mg·g⁻¹; 温度、光合有效辐射、土壤水势、相对湿度与叶中人参皂苷含量显著相关 ($P<0.05$); 人参叶中 *HMGR* 基因的表达与 Rb₂ 含量显著负相关 ($P<0.05$), *SS* 基因的表达与 Rg₁、Re 含量显著负相关 ($P<0.05$), *β-AS* 基因的表达分别与 Rc、Rb₂ 含量呈显著 ($P<0.05$)、极显著 ($P<0.01$) 负相关; 温度、光合有效辐射、土壤水势和相对湿度与人参皂苷含量灰色关联度较高, 达到 0.727 9~0.871 1。【结论】在生态因子调控下, 人参皂苷合成关键酶基因的表达影响人参皂苷的合成与积累。

关键词: 人参; 生态因子; 人参皂苷; 基因表达; 相关性; 灰色关联度
中图分类号: S567.51; R948.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-411X(2018)03-0039-09

Correlation analyses of ecological factors, ginsenoside contents and expression of associated key enzymes in *Panax ginseng* leaves

YANG Linlin, ZHANG Tao, YANG Limin, HAN Mei
(College of Chinese Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: 【Objective】To clarify the physiological and ecological mechanisms of ginsenoside biosynthesis, and reveal the relationship between ecological/genetic factors and quality of medicinal materials. 【Method】Cultivated four-year-old *Panax ginseng* leaves at different growth times were used as materials. The contents of eight ginsenosides (Rg₁、Re、Rf、Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc、Rd) in leaves were detected by HPLC. The expression of seven key enzyme genes (*HMGR*, *FPS*, *SS*, *SE*, *DS*, *β-AS*, *CYP716A47*) involved in ginsenoside biosynthesis in ginseng leaves were determined by real-time quantitative fluorescent PCR. The effect of ecological factors and the expression of key enzyme genes on the synthesis and accumulation of ginsenosides in *P. ginseng* leaves were investigated by correlation and grey relational analysis. 【Result】The expression of key enzyme genes involved in ginsenoside synthesis was active from July 13th to September 29th, and the expression of different genes synergistically increased or decreased. The contents of ginsenoside Re and

Rg₁ in *P. ginseng* leaves were the highest, reached the maximum of 60.30 and 39.38 mg·g⁻¹ respectively in the growth period of ginseng root from August 31st to September 13th. Temperature, photosynthetic active radiation (PAR), soil water potential and relative humidity all had significant correlation with ginsenoside contents in *P. ginseng* leaves ($P<0.05$). *HMGR* expression in *P. ginseng* leaves was negatively correlated with Rb₂ content ($P<0.05$), *SS* expression was negatively correlated with Rg₁ or Re content ($P<0.05$), and β -*AS* expression was negatively correlated with Rc content ($P<0.05$) and Rb₂ content ($P<0.01$). Grey correlation analysis results showed that the major ecological factors that influenced ginsenoside contents in *P. ginseng* leaves were temperature, PAR, soil water potential and relative humidity, with their grey correlation values ranging from 0.727 9 to 0.871 1. 【Conclusion】 Under the regulation and control of ecological factors, the synthesis and accumulation of ginsenosides were influenced by the expression of involved key enzyme genes.

Key words: *Panax ginseng*; ecological factor; ginsenoside; gene expression; correlation; grey correlation degree

人参 *Panax ginseng* 是吉林省重要的人工栽培药用植物之一, 人参皂苷是其主要药效成分^[1], 有达玛烷型原人参二醇型皂苷 (Protopanaxadiol, PPD)、原人参三醇型皂苷 (Protopanaxatriol, PPT) 和齐墩果烷型人参皂苷 (Oleanane type saponins, OTS)。研究表明人参叶中皂苷含量显著高于根^[2-3], 并且价格低廉, 有广阔的开发前景。近年来, 人参皂苷生物合成途径已逐渐明晰^[4-7], 其中调控人参皂苷合成的关键酶 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, *HMGR*) 是植物中的 MVA 途径中的第 1 个限速酶, 影响 3-异戊二烯焦磷酸 (Isopentenyl pyrophosphate, IPP) 和二甲基烯丙基焦磷酸 (Dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP) 的产量; 法尼基焦磷酸合成酶 (Farnesyl pyrophosphate synthase, *FPS*) 可催化 IPP 和牻牛儿基焦磷酸 (Geranyl pyrophosphate, GPP) 生成法尼基焦磷酸 (Farnesyl pyrophosphate, FPP); 鲨烯合成酶 (Squalene synthase, *SS*) 将 FPP 催化合成鲨烯; 鲨烯环氧酶 (Squalene epoxidase, *SE*) 催化鲨烯形成 2,3-氧化鲨烯; 达玛烷二醇合成酶 (Dammarenediol synthase, *DS*)、 β -香树素合成酶 (β -amyrin synthase, β -*AS*) 分别催化 2,3-氧化鲨烯形成达玛烷型、齐墩果烷型人参皂苷的前体, 最终经细胞色素 P450 (Cytochrome P450, *CYP450*)、糖基转移酶 (Glycosyl transferase, *GT*) 进行碳环修饰、糖基化修饰, 以超基因家族的形式存在于植物中, 从而可以形成复杂多样的单体人参皂苷, 目前已经得到功能验证的有 *CYP716A47*、*CYP716A52v2*、*CYP716A53v3*、*CYP93E1* 等基因。但相关研究多集中于关键酶基因的发掘、功能验证等工作方面, 对于植物内在基因与外部环境的响应机制研究还较少。

吉林省长白山地区独特的自然地理环境形成了人参药材的道地产区, 而人参皂苷的合成受生长

所在的环境和体内关键酶基因的共同调控^[8-9]。然而对于人参叶中人参皂苷的研究多集中于药物化学、药理学研究, 人参叶中皂苷的生物合成受内在基因与外部环境的调控机制还不明确。因而本研究以人参叶为试验材料, 对不同生长时期叶中 8 种单体人参皂苷 (Rg₁、Re、Rf、Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc 和 Rd) 含量以及调控人参皂苷合成的 7 个关键酶基因 (*HMGR*、*FPS*、*SS*、*SE*、*DS*、 β -*AS* 和 *CYP716A47*) 表达量进行测定和分析, 结合人参样地的生态因子综合分析关键酶基因表达量与人参皂苷含量的关系, 以明确人参皂苷生物合成的生理生态机制, 揭示生态因子和遗传因素与药材质量的关系, 为实现对药材质量的调控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

4 年生人参于 2016 年 5 月 30 日、6 月 12 日、6 月 22 日、7 月 3 日、7 月 13 日、7 月 24 日、8 月 5 日、8 月 18 日、8 月 31 日、9 月 13 日和 9 月 29 日取自吉林省抚松县松江河林业局板石河林场人参产业技术与示范抚松基地 (42°N, 127°E), 田间取样采用 5 点取样法, 每次随机采集固定田垄的人参 10 株, 经吉林农业大学杨利民教授鉴定为人参。将人参叶片轻轻摘下, 每次采集约 50 枚小叶片, 将新鲜叶片置于冰盒中保鲜带回实验室, 清洗干净并用吸水纸吸去水分。将每次采集的小叶片随机选择 10 枚分装于冻存管, 液氮对样品进行快速冷冻后贮存于-80℃超低温冰箱以用于后续人参皂苷合成关键酶基因表达量测定。将剩余清洗干净的约 40 枚人参小叶片置于烘箱中低温烘干至恒质量, 用粉碎机磨成细粉, 过 40 目筛后用于人参皂苷含量测定。

主要试剂: 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒、
<http://xuebao.scau.edu.cn>

BioTeke super RT Kit cDNA 合成试剂盒购于长春百金, SYBR® Premix Ex Taq™ 荧光染料等购于长春海灵科贸, 甲醇、乙腈 (色谱纯, Fisher Scientific), 甲醇 (萃取剂) 及其他试剂均为国产分析纯。

主要仪器: 美国 HOBO® 小型气象站; 美国 Aligent 荧光定量 PCR 仪 Mx3000P; 美国 Agilent 高效液相色谱仪 1260; 美国 Thermo 核酸/蛋白定量仪 NanoDrop 2000; 美国 Thermo 微量离心机 Heraeus Fresco 21; 上海之信仪器有限公司智能超声波清洗器 DL-820E; 日本 SANYO 超低温冰箱 MDF-382E。

1.2 样地气象数据采集

使用 HOBO® 小型气象站于采样地进行 24 h 监

测, 收集样地温度、降雨量、光合有效辐射、土壤水势、相对湿度等数据。

1.3 关键酶基因表达量测定

1.3.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成 每次取人参叶组织样品约 50~100 mg 在液氮中研磨成粉, 按照长春百金公司的总 RNA 提取试剂盒的说明书提取总 RNA, 采用 NanoDrop 2000 检测仪测定 RNA 质量浓度。采用 BioTeke super RT Kit cDNA 试剂盒将总 RNA 逆转录合成 cDNA, 于-20 ℃ 条件下保存备用。

1.3.2 引物设计与合成 荧光定量 PCR 特异引物由上海生工生物工程有限公司合成, 其序列见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 引物
Tab. 1 Primers of quantitative fluorescent PCR

基因	登录号	上游引物 (5'→3')	下游引物(5'→3')
HMGR	KJ939263	TTGCGGGTCCATTGCTGCT	CTCTGGTCATCCCATCTTTTA
FPS	DQ087959	CAAGAAGCATTTCCGACAA	CTCTCCTACAAGGGTGGTGA
SS	KJ939264	GGACTTGTTGGATTAGGGTTG	ACTGCCTTGGCTGAGTTTTC
SE	KJ939265	GGACTTAAGTGAAGAGCCG	AGGGGTAAGAAAGCCTGGTG
DS	KJ939266	ACCGCCGTTGAGATTAGATG	ATAGGGCAATGATAAGGGGAG
β-AS	KJ939267	AAAGCTCTGCAGACAACCATG	ATCTGGGATCCTTGCAAGGTG
CYP716A47	JN604536	TCACCTTCGTTCTCAACTATC	TCTTCCTCAAATCCTCCCAAT
Cyclophilin	KF699321	CAGGCAAAGAAAAAGTCAAGTG	AAAGAGACCCATTACAATACGC

1.3.3 实时荧光定量 PCR 反应体系: 灭菌水 7.5 μL, SYBR® Premix Ex Taq™ 10 μL, 引物各 0.5 μL, 50×ROX Reference Dye II 0.5 μL, cDNA 模板 1 μL, 总计 20 μL。反应程序: 94 ℃ 预变性 30 s; 4 ℃ 变性 5 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 20 s, 循环 45 次。以人参亲环蛋白基因 (*Cyclophilin*) 为内参^[10], 不同生长时期人参叶片样品重复反应 3 次。

1.3.4 相对表达量的测定 以 5 月 30 日人参叶片中的表达量作为对照, 根据表 1 中各基因的引物序列, 按“1.3.3”的反应条件分别对人参 *HMGR*、*FPS*、*SS*、*SE*、*DS*、*β-AS*、*CYP716A47* 基因进行 RT-PCR 扩增, 用 MxPro 软件收集数据, 采用 2^{-ΔΔC_t} 法分析结果^[11]。

1.4 单体人参皂苷含量测定

1.4.1 色谱条件 依利特 Hypersil ODS2 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为水-乙腈溶液, 梯度洗脱条件: 乙腈溶液体积分数 (进间) 为 19%~22% (0~24.0 min), 22%~26%(24.0~26.0 min), 26%~32% (26.0~30.0 min), 2%~34%(30.0~50.0 min), 34%~80% (50.0~50.1 min), 80%(50.1~65.0 min)。流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 203 nm, 柱温 25 ℃。测定 8 种单体皂苷的峰面积, 并通过线性方程计算其含量^[12]。

1.4.2 样品单体皂苷含量测定 精密称取不同生长时期的人参叶样品 1.000 g, 加入 30 mL 甲醇, 超声提取 30 min, 提取 3 次后合并滤液。使用旋转蒸发仪 50 ℃ 条件下挥干甲醇, 用甲醇溶解并定容至 10 mL, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后取供试样品 20 μL 按照“1.4.1”的条件进样检测。每个样品重复进样 3 次。

1.5 数据处理

人参采样地收集到的气象数据用 Excel 软件处理; 人参皂苷合成关键酶基因表达量数据、人参皂苷含量数据和气象数据采用 SPSS 19.0 进行处理, 采用 Duncan's 新复极差法进行多重比较检验数据的显著性差异, 用 Pearson 法分析生态因子与人参皂苷含量及其关键酶基因表达的相关系数; 采用 DPS 7.05 计算生态因子与人参皂苷含量及其关键酶基因表达之间的灰色关联度。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取结果

提取不同时期人参叶组织的总 RNA, 进行质量浓度和纯度检测, 不同时期人参叶组织总 RNA 的

检测结果如表 2 所示。表 2 的结果表明,总 RNA 的质量浓度和纯度均较高,可用于下一步试验。

2.2 不同生长时期人参叶片中的关键酶基因表达

用实时荧光定量 PCR 的方法检测了人参叶片不同生长时期 *HMGR*、*FPS*、*SS*、*SE*、*DS*、 β -*AS*、*CYP716A47* 基因的表达量,结果如图 1 所示。人参 *HMGR*、*FPS*、*DS*、 β -*AS*、*CYP716A47* 基因在叶中的

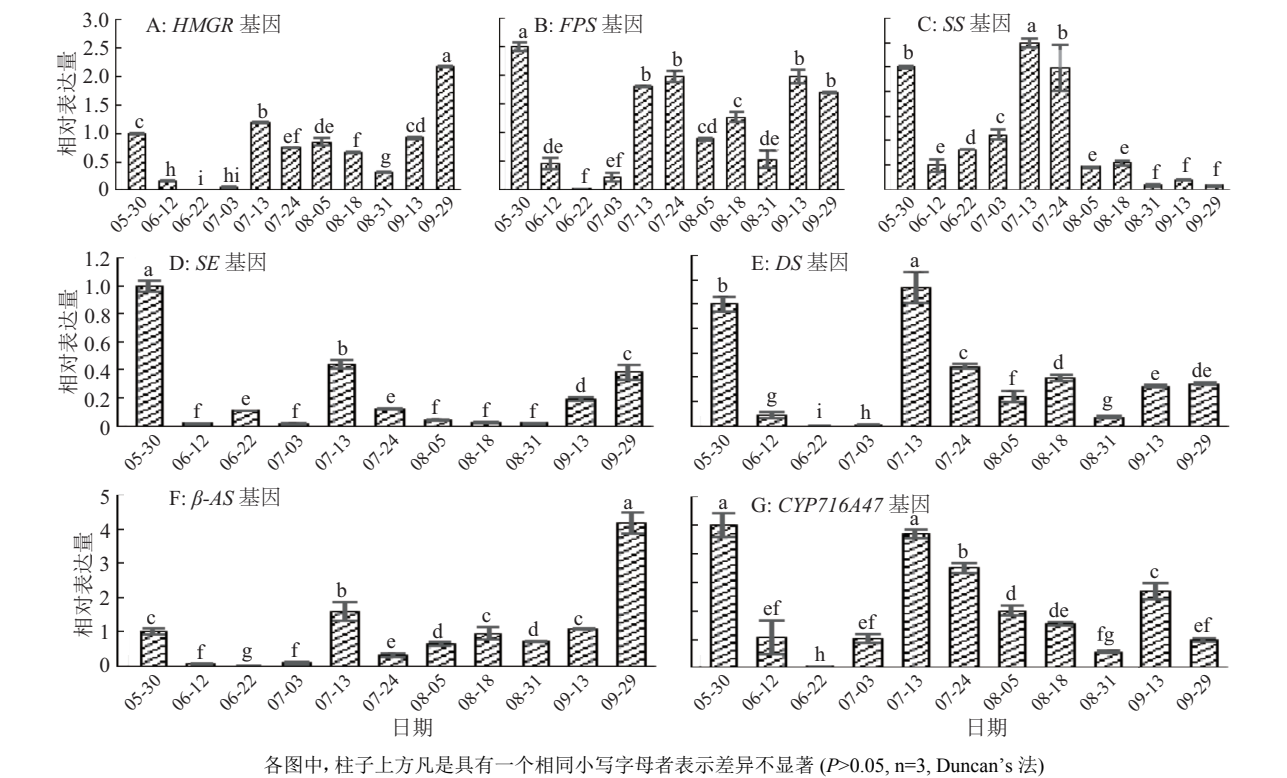
表 2 不同生长时期人参叶总 RNA 的检测结果
Tab. 2 The detection of total RNA from *Panax ginseng* leaves at different growth time

采样时间	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$	$\rho(\text{RNA})/(\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1})$
05-30	2.106	2.642	1 310
06-12	2.116	2.598	1 604
06-22	2.099	2.949	814
07-03	2.094	2.594	1 608
07-13	2.094	2.876	846
07-24	2.107	2.584	1 690
08-05	2.095	2.907	750
08-18	2.091	2.990	598
08-31	2.098	2.316	402
09-13	2.100	2.856	1 034
09-29	1.830	1.677	471

表达有相似的变化趋势,7 月 13 日—9 月 29 日是人参 *HMGR*、*FPS*、*DS*、 β -*AS*、*CYP716A47* 基因表达的活跃时期,而此时也是人参生长处于绿果期到果后参根生长期,是人参皂苷积累的重要时期;人参 *SS* 基因在展叶期(5 月 30 日)和绿果期(7 月 13—24 日)均有较高的表达,但其余生长时期表达并不活跃;人参 *SE* 基因表达较为活跃的时期是展叶期(5 月 30 日)、绿果期(7 月 13 日)和枯萎期(9 月 29 日),其他生长时期有较低水平的表达;7 个人参皂苷合成关键酶基因在 6 月 12 日—7 月 3 日表达量均处于极低的水平,在 6 月 22 日 7 个基因的表达量急剧下调,甚至不表达,此时人参处于生殖生长的开花期,相关关键酶基因的表达下调可能导致了人参皂苷合成减少。对人参叶中 7 个关键酶基因在不同生长时期表达量进行相关性分析,结果见表 3,多个关键酶基因之间多表现出了显著相关性($P<0.05$),说明人参皂苷合成关键酶基因在叶中的表达有协同增减的趋势,它们共同调控了人参叶片中皂苷的合成与积累,造成不同生长时期叶片中的人参皂苷含量差异。

2.3 不同生长时期人参叶片中单体皂苷含量变化

4 年生人参叶中 8 种单体人参皂苷含量变化如图 2 所示,人参叶中单体皂苷平均含量高低顺序为



各图中,柱子上方凡是具有一个相同小写字母者表示差异不显著 ($P>0.05$, $n=3$, Duncan's 法)
图 1 不同生长时期人参叶片中的关键酶基因荧光定量 PCR 表达分析 ($n=3$)
Fig. 1 Expression analysis of key enzyme genes in *Panax ginseng* leaves at different growth times by quantitative fluorescent PCR

表 3 人参叶片中基因表达的相关性¹⁾

Tab. 3 Correlation expression among different genes in *Panax ginseng* leaves

关键酶基因	<i>HMGR</i>	<i>FPS</i>	<i>SS</i>	<i>SE</i>	<i>DS</i>	β - <i>AS</i>	<i>CYP716A47</i>
<i>HMGR</i>	1	0.705*	0.082	0.507	0.529	0.793**	0.380
<i>FPS</i>	0.705*	1	0.497	0.714*	0.806**	0.428	0.833**
<i>SS</i>	0.082	0.497	1	0.559	0.784**	0.198	0.817**
<i>SE</i>	0.507	0.714*	0.559	1	0.784**	0.382	0.716*
<i>DS</i>	0.529	0.806**	0.784**	0.784**	1	0.551	0.924**
β - <i>AS</i>	0.793**	0.428	0.198	0.382	0.551	1	0.260
<i>CYP716A47</i>	0.380	0.833**	0.817**	0.716*	0.924**	0.260	1

1) “*” 和 “**” 分别表示相关性达到 0.05 和 0.01 的显著水平(Pearson 法)

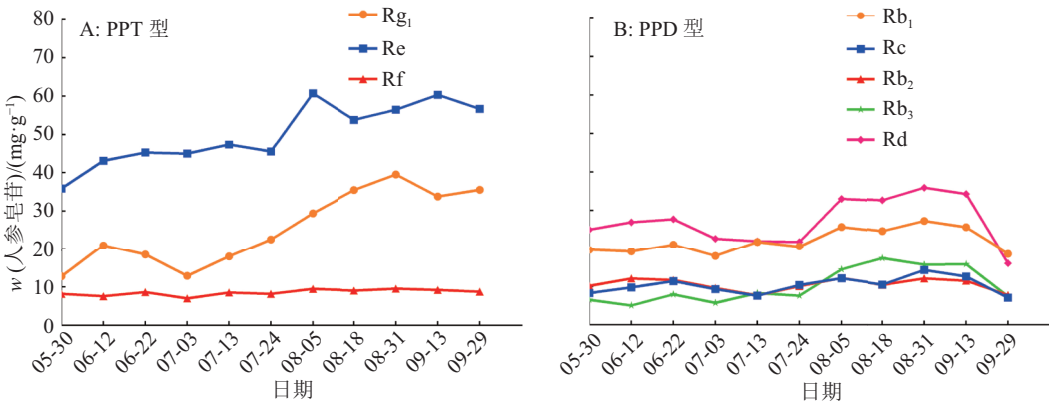


图 2 不同生长时期人参叶片中人参皂苷含量 (n=3)

Fig. 2 The contents of ginsenosides in *Panax ginseng* leaves at different growth times (n=3)

Re>Rg₁、Rd>Rb₁>Rb₂、Rf、Rc、Rb₃, 不同生长时期各个单体皂苷变化趋势并不相同, 存在明显差异。PPT 型人参皂苷 Re、Rg₁ 含量随着生长时期的变化呈逐渐增加的趋势, Rf 含量在各个生长时期变化不大, 三者 在果后参根生长期 (8 月 31 日—9 月 13 日) 达到最大值, 分别为 60.30、39.38 和 9.65 mg·g⁻¹。PPD 型人参皂苷 (Rd、Rb₁、Rb₃、Rc、Rb₂) 有相似的变化趋势, 它们在人参果期 (7 月 3 日—7 月 24 日) 含量有所降低, 然后逐渐增加, 在果后参根生长期达到最大值 35.81、27.08、15.98、14.42 和 12.22 mg·g⁻¹。不同生长时期中 PPT 型人参皂苷与 PPD 型人参皂苷在叶中的比例约等于 1:1, 9 月 20 日枯萎期 PPD 型人参皂苷突然急剧降低, 但是 PPT 型人参皂苷的含量并未发生巨大波动, 枯萎期人参样地霜害严重, 环境最低温度达-4.82℃, 环境的急剧变化可能直接影响了叶中 PPD 型人参皂苷含量, 但对 PPT 型人参皂苷影响不大。对不同生长时期叶中 8 种单体皂苷含量进行相关性分析, 结果见 表 4, PPT 型人参皂苷 (Rg₁、Re、Rf) 之间极显著相关 (P<0.01), 而它们与 PPD 型人参皂苷之间的相关性较弱, 同时 PPD 型人参皂苷 (Rd、Rb₁、Rb₃、Rc、

Rb₂) 之间多达到极显著相关水平 (P<0.01)。相关性分析结果表明, 人参叶中不同构型的人参皂苷的合成与积累存在不同规律, 相似构型的人参皂苷存在协同增减的趋势。

2.4 生态因子、人参叶中关键酶基因表达与 人参皂苷含量的相关性分析

采样地人参生长各个时期生态因子数据整理后如 表 5 所示。人参采样地 5 月 30 日—9 月 29 日最低温度为-4.82℃, 最高温度达 32.76℃; 各个生长期日均光合有效辐射范围为 292.58~525.30 μmol·m⁻²·s⁻¹; 生长期总降雨量为 459.905 mm, 空气相对湿度 64.93%~86.92%, 土壤水势 (-0.290~-0.101) 较高, 样地整体水分充足, 适宜人参生长。

生态因子与人参皂苷含量的相关性分析结果见 表 6, 人参叶中皂苷的形成受多种生态因子影响, 其中温度、光合有效辐射、土壤水势对人参皂苷的合成有抑制作用, 而降雨和空气相对湿度可促进人参皂苷的合成。温度与人参皂苷 Rg₁、Rb₃ 含量呈极显著负相关 (P<0.01), 温度与人参皂苷 Re、Rf、Rb₁、Rd 含量呈显著负相关 (P<0.05), 说明过高的温度显著抑制了叶片中人参皂苷的合成, 适当的降低温度

表 4 不同人参皂苷含量间的相关性¹⁾

Tab. 4 Correlation of the contents of different ginsenosides

人参皂苷	PPT 型			PPD 型				
	Rg ₁	Re	Rf	Rb ₁	Rc	Rb ₂	Rb ₃	Rd
Rg ₁	1	0.853**	0.789**	0.691*	0.504	0.221	0.779**	0.470
Re	0.853**	1	0.750**	0.706*	0.499	0.183	0.766**	0.456
Rf	0.789**	0.750**	1	0.857**	0.550	0.265	0.825**	0.583
Rb ₁	0.691*	0.706*	0.857**	1	0.800**	0.520	0.932**	0.865**
Rc	0.504	0.499	0.550	0.800**	1	0.837**	0.692*	0.879**
Rb ₂	0.221	0.183	0.265	0.520	0.837**	1	0.400	0.809**
Rb ₃	0.779**	0.766**	0.825**	0.932**	0.692*	0.4	1	0.807**
Rd	0.470	0.456	0.583	0.865**	0.879**	0.809**	0.807**	1

1) “*” 和 “**” 分别表示相关性达到 0.05 和 0.01 的显著水平(Pearson 法)

表 5 采样地各生长时期生态因子

Tab. 5 Ecological factors of the sample plot at different growth time

日期	生长期温度/℃			光合有效辐射/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	土壤水势	降雨量/mm	相对湿度/%
	平均	最低	最高				
05-30	14.85	1.60	25.95	525.30	−0.178	19.717	64.93
06-12	15.54	6.22	25.17	400.74	−0.185	49.461	78.42
06-22	16.46	8.63	26.34	344.28	−0.138	69.465	82.45
07-03	18.68	9.03	28.70	476.74	−0.101	26.405	70.46
07-13	20.20	11.77	31.12	402.56	−0.128	31.277	82.74
07-24	21.66	13.32	29.90	363.97	−0.150	53.674	85.12
08-05	22.12	9.03	32.76	479.88	−0.263	10.002	82.34
08-18	19.70	10.99	29.50	376.51	−0.289	65.394	85.63
08-31	15.14	4.15	25.56	306.02	−0.290	106.323	86.92
09-13	13.80	0.73	22.86	316.32	−0.289	22.937	86.77
09-29	12.40	−4.82	23.63	292.58	−0.288	5.250	78.02

表 6 生态因子与叶中人参皂苷含量的相关性¹⁾

Tab. 6 Correlation between ecological factors and ginsenoside contents in leaves

生态因子	PPT 型			PPD 型				
	Rg ₁	Re	Rf	Rb ₁	Rc	Rb ₂	Rb ₃	Rd
温度	−0.810**	−0.694*	−0.652*	−0.738*	−0.468	−0.318	−0.881**	−0.732*
光合有效辐射	−0.685*	−0.511	−0.454	−0.281	−0.295	0	−0.317	−0.075
土壤水势	−0.925**	−0.780**	−0.782**	−0.655*	−0.425	−0.272	−0.767**	−0.511
降雨	0.267	−0.040	0.210	0.390	0.588	0.450	0.302	0.470
相对湿度	0.685*	0.669*	0.648*	0.697*	0.591	0.280	0.656*	0.474

1) “*” 和 “**” 分别表示相关性达到 0.05 和 0.01 的显著水平(Pearson 法)

是提高叶片中皂苷含量的有效手段之一。光合有效辐射与人参皂苷 Rg₁ 含量显著负相关 ($P<0.05$), 人参是喜阴植物, 过高的光照强度会抑制体内代谢, 因而皂苷含量降低。土壤水势的变化影响植物对水分的吸收, 因而对叶片中皂苷含量影响巨大, 土壤水势与人参皂苷 Rg₁、Re、Rf、Rb₃ 含量极显著负相关 ($P<0.01$), 土壤水势与人参皂苷 Rb₁ 含量显著负相关 ($P<0.05$), 说明参地土壤水分过高制约了人参皂苷的合成。降雨对叶片中人参皂苷含量有促进作用, 但未达到显著水平。空气相对湿度对人参叶片

http://xuebao.scau.edu.cn

有直接作用,可促进人参叶片中皂苷的合成,空气相对湿度与人参皂苷 Rg_1 、 Re 、 Rf 、 Rb_1 、 Rb_3 的含量显著正相关 ($P<0.05$),说明可适当提高环境中相对湿度以利于人参皂苷的合成。

人参皂苷的合成受多种关键酶基因调控,如表 7 所示,*HMGR* 基因的表达与人参皂苷 Rb_2 含量显著负相关 ($P<0.05$);*SS* 基因的表达与人参皂苷 Rg_1 、 Re 含量呈显著负相关 ($P<0.05$); β -*AS* 基因的表达与人参皂苷 Rc 含量显著负相关 ($P<0.05$),与 Rb_2 的含量极显著负相关 ($P<0.01$)。但人参皂苷合成某 1 个关键酶基因的表达可能仅作用于人参皂

苷合成途径中的某 1 个位点,由于人参皂苷合成途径中有多个调控位点,某 1 个关键酶基因与最终的人参皂苷合成之间还有多个步骤,因此并非所有基因均与皂苷含量的相关性达到显著水平。

2.5 生态因子、人参叶中关键酶基因表达与人参皂苷含量的灰色关联度分析

表 8、表 9 分析了生态因子、关键酶基因表达与 人参皂苷灰色关联度。相对湿度与 人参皂苷 Re 、 Rf 、 Rb_1 、 Rb_2 、 Rd 灰色关联度均高于其他生态因子,为 0.727 9~0.871 1,说明相对湿度对叶中人参皂苷的积累起主导作用,是影响叶中人参皂苷含量的主

表 7 基因表达量与叶中人参皂苷含量的相关性¹⁾
Tab. 7 Correlation between gene expression and ginsenoside contents in leaves

关键酶基因	PPT 型			PPD 型				
	Rg_1	Re	Rf	Rb_1	Rc	Rb_2	Rb_3	Rd
<i>HMGR</i>	0.317	0.310	0.318	-0.089	-0.519	-0.655*	0.013	-0.464
<i>FPS</i>	0.025	-0.059	0.172	-0.021	-0.382	-0.462	0.035	-0.259
<i>SS</i>	-0.690*	-0.662*	-0.382	-0.368	-0.513	-0.497	-0.472	-0.468
<i>SE</i>	-0.381	-0.471	-0.071	-0.318	-0.560	-0.452	-0.336	-0.383
<i>DS</i>	-0.292	-0.319	0.027	-0.103	-0.553	-0.594	-0.137	-0.327
β - <i>AS</i>	0.157	0.107	0.102	-0.226	-0.707*	-0.854**	-0.082	-0.559
<i>CYP716A47</i>	-0.381	-0.343	-0.067	-0.078	-0.404	-0.409	-0.144	-0.230

1) “*” 和 “**” 分别表示相关性达到 0.05 和 0.01 的显著水平(Pearson 法)

表 8 生态因子与叶中人参皂苷含量的灰色关联度
Tab. 8 Grey correlation degrees between ecological factors and ginsenoside contents in leaves

生态因子	PPT 型			PPD 型				
	Rg_1	Re	Rf	Rb_1	Rc	Rb_2	Rb_3	Rd
温度	0.552 6	0.702 9	0.695 3	0.737 9	0.695 7	0.662 4	0.555 1	0.676 0
光合有效辐射	0.554 3	0.693 9	0.681 1	0.700 6	0.663 8	0.697 7	0.544 1	0.648 2
土壤水势	0.826 3	0.670 9	0.617 0	0.657 2	0.675 0	0.585 4	0.677 4	0.691 8
降雨	0.534 3	0.444 1	0.433 3	0.440 6	0.493 1	0.497 0	0.498 7	0.475 8
相对湿度	0.600 1	0.805 5	0.871 1	0.806 8	0.783 8	0.764 3	0.544 9	0.727 9

表 9 基因表达量与叶中人参皂苷含量的灰色关联度
Tab. 9 Grey correlation degrees between genes expression and ginsenoside contents in leaves

关键酶基因	PPT 型			PPD 型				
	Rg_1	Re	Rf	Rb_1	Rc	Rb_2	Rb_3	Rd
<i>HMGR</i>	0.494 7	0.504 2	0.496 6	0.501 2	0.518 9	0.497 0	0.418 7	0.468 9
<i>FPS</i>	0.468 8	0.446 2	0.436 2	0.416 0	0.406 9	0.388 2	0.430 0	0.379 0
<i>SS</i>	0.352 0	0.373 0	0.351 3	0.355 6	0.356 5	0.347 9	0.384 7	0.343 6
<i>SE</i>	0.377 4	0.347 3	0.340 2	0.330 9	0.309 8	0.314 6	0.351 9	0.315 5
<i>DS</i>	0.383 0	0.424 6	0.449 2	0.430 7	0.409 5	0.408 4	0.370 8	0.366 7
β - <i>AS</i>	0.404 9	0.446 7	0.473 5	0.454 0	0.429 7	0.468 2	0.381 8	0.420 8
<i>CYP716A47</i>	0.466 2	0.430 9	0.423 6	0.432 1	0.449 2	0.416 2	0.460 6	0.446 7

导生态因子;土壤水势也是影响叶中人参皂苷含量的重要生态因子,土壤水势对人参皂苷 Rg_1 和 Rb_3 含量的影响高于其他生态因子,灰色关联度分别为 0.826 3 和 0.677 4;温度、光合有效辐射是影响叶中人参皂苷含量的次要生态因子,它们与人参皂苷含量的灰色关联值也均处于较高水平。

叶中关键酶基因中与人参皂苷含量关联值较高的是 *HMGR*、*FPS*、 β -*AS*、*CYP716A47*, 关联值为 0.379 0~0.518 9, 明显小于生态因子与人参皂苷含量的关联值,说明生态因子是影响人参皂苷合成的主导因子,而关键酶基因的表达则是调控人参皂苷体内流向,人参皂苷含量的高低受外部环境的影响高于内在遗传因素。

3 讨论与结论

药材质量的形成受外部环境的影响,外部环境的变化导致药材内在遗传因素调控药效成分的生物合成对环境因子的响应呈现出多样性,内在遗传因素与外部环境因素共同决定了药材质量的形成^[13]。本研究发现温度对叶片中多种人参皂苷 (Rg_1 、 Re 、 Rf 、 Rb_1 、 Rb_3 、 Rd) 的积累有显著的抑制作用,这与谢彩香等^[14]和贾光林等^[15]的研究一致,说明在一定温度范围内,叶片中人参皂苷的含量随着温度升高而降低,适当低温利于人参皂苷积累;光照对人参生长的影响作用不同,20% 透光棚下人参根中皂苷含量最高,而 15% 透光棚下叶片中皂苷含量最高^[16],人参叶片对光照的反应敏感,过高的光合有效辐射可能损伤叶片,因而造成人参皂苷的减少;土壤中水分含量的高低是影响药材质量形成的重要因子,适度的干旱胁迫可以提高药材中有效成分的含量^[17],包京姍等^[18]发现土壤相对含水量为 60%~80% 时有利于人参生长,而本研究中人参样地土壤水势较高 ($-0.290 \sim -0.101$),显著影响了叶片中人参皂苷含量,适当进行人工调控,降低水分可对人参皂苷的合成有积极作用;空气湿度可适当缓解土壤的干旱限制,利于植物叶片生长以及生命活动的进行^[19],本研究中空气湿度对人参叶片有直接作用,该样地空气相对湿度在 0.649~0.869,适宜人参生长,对叶片中人参皂苷含量的积累起到了显著作用。

随着分子生物学的深入发展,人们对于药材质量的形成也着眼于内在遗传因素的影响。Kim 等^[20]发现在连续 2~3 d 的黑暗条件下 *HMGR* 基因活性提高,推测 *HMGR* 影响人参皂苷合成可能需要黑暗的条件;Park 等^[21]将积雪草的 *FPS* 基因导入到人参不定根中并过量表达,结果人参皂苷含量比对照组

有显著提高;蒋世翠等^[22]在人参愈伤组织中导入了 *SS* 基因干扰表达载体,转化后 *SS* 基因表达量明显降低,人参皂苷含量也有所变化;Han 等^[23]在转基因人参根中沉默 *PgSQT1* 基因,发现人参皂苷含量降低;Han 等^[24]通过 RNAi 技术使 *DS* 基因沉默,发现人参根中皂苷产量显著降低。对人参皂苷合成关键酶基因多集中于报道单一基因功能,或者不同组织部位的基因表达差异^[25],并未对人参组织在不同生长时期生长发育的基因表达变化进行研究,而本研究对多基因与环境因子和人参皂苷关系进行了研究,发现在人参叶片中 *HMGR* 基因的表达与 Rb_2 含量显著负相关;*SS* 基因与 Rg_1 、 Re 含量显著负相关; β -*AS* 基因与 Rc 、 Rb_2 含量显著负相关。

人参样地环境复杂多变,在人参整个生长过程中也受到多种因素的影响,某一个单一基因与人参皂苷含量的相关性就很难达到显著程度,因此本研究中多数关键酶基因与人参皂苷含量的相关性并未达到显著水平,可能有多种原因:1) 人参皂苷最终的合成是受多步反应催化的,多种酶参与了人参皂苷的合成,而某一个关键酶基因的表达仅作用于一个位点,对最终人参皂苷的合成促进作用有限;2) 由于同源基因的存在,每一步反应可能有多个同源基因的表达所影响,本文中所研究的基因表达没达到显著水平,可能存在其他未被发现的同源基因的共同作用;3) 从某一关键酶基因的表达达到某一种酶的合成,还需要多步反应催化,可能关键酶基因表达高,但由于生命活动的变化,植物体合成关键酶的量有限,所以最终与人参皂苷含量相关性不显著;4) 研究发现植物次生代谢产物的合成往往是多个基因家族形成的复杂调控网络所调控产生,在数量庞大的基因家族群中单一基因的作用较小,而我们对于药用植物次生代谢的基因认识还较少,关键基因发掘的数量不够,因此对于阐明其分子机制还需要深入研究;5) 由于药材药效成分形成的相关分子生物学研究进展有限,本研究仅从转录水平入手,今后还应从翻译水平、翻译后酶(蛋白)催化水平进一步揭示药材质量形成的分子生态机制。

对生态因子、关键酶基因表达与人参皂苷含量的灰色关联度进行计算,生态因子(温度、光和有效辐射、土壤水势、相对湿度)与人参皂苷灰色关联度在 0.552 6~0.871 1 之间,说明各个生态因子与叶中人参皂苷积累有密切联系,而关键酶基因表达与人参皂苷灰色关联度在 0.309 8~0.518 9 之间,生态因子是叶片中有效成分积累的主导外部因素,其作用具有整体性,影响着人参的整个生命活动,而某一

关键酶基因所影响的节点有限, 内在遗传因素决定了人参皂苷前体物质的最终流向, 但最终产物的多少还受外部生态因子的调控。

目前对于人参中人参皂苷形成与积累的规律研究的不足, 制约了对人参药材质量的调控, 从分子生态学的角度阐明影响人参皂苷形成的主导生态因子与内在遗传因素, 对实现药材质量“安全、有效、稳定、可控”的目标有重要意义。

参考文献:

[1] 黎阳, 张铁军, 刘素香, 等. 人参化学成分和药理研究进展[J]. 中草药, 2009, 40(1): 164-166.

[2] 逢世峰, 李亚丽, 许世泉, 等. 人参不同部位人参皂苷类成分研究[J]. 人参研究, 2015, 27(1): 5-8.

[3] 张兰兰, 高文远, 宋兆辉, 等. 不同年份林下山参叶中皂苷类成分含量变化研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(17): 2530-2533.

[4] ZHAO C L, CUI X M, CHEN Y P, et al. Key enzymes of triterpenoid saponin biosynthesis and the induction of their activities and gene expressions in plants[J]. Nat Prod Commun, 2010, 5(7): 1147-1158.

[5] HAN J Y, KIM H J, KWON Y S, et al. The Cyt P450 enzyme CYP716A47 catalyzes the formation of protopanaxadiol from dammarenediol-II during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng*[J]. Plant Cell Physiol, 2011, 52(12): 2062-2073.

[6] SAWAI S, SAITO K. Triterpenoid biosynthesis and engineering in plants[J]. Front Plant Sci, 2011. doi: 10.3389/fpls.2011.00025.

[7] 林彦萍, 张美萍, 王康宇, 等. 人参皂苷生物合成研究进展[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(23): 4292-4302.

[8] 杨利民. 中药资源生态学及其科学问题[J]. 吉林农业大学学报, 2008, 30(4): 506-510.

[9] 焦晓林, 高微微. 环境因子对药用植物三萜皂苷合成影响的研究进展[J]. 中草药, 2011, 42(2): 398-402.

[10] LIU J, WANG Q, SUN M, et al. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR normalization in *Panax ginseng* at different stages of growth and in different organs[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e112177.

[11] 杨怡姝, 孙晓娜, 王小利, 等. 实时荧光定量 PCR 技术的操作实践[J]. 实验室研究与探索, 2011, 30(7): 15-19.

[12] 林红梅, 张永刚, 李岳桦, 等. 不同产地人参中 8 种人参单体皂苷含量比较[J]. 特产研究, 2013, 35(4): 63-66.

[13] 杨利民, 张永刚, 林红梅, 等. 中药材质量形成理论与控制技术研究进展[J]. 吉林农业大学学报, 2012, 34(2): 119-124.

[14] 谢彩香, 索凤梅, 贾光林, 等. 人参皂苷与生态因子的相关性[J]. 生态学报, 2011, 31(24): 7551-7563.

[15] 贾光林, 黄林芳, 索凤梅, 等. 人参药材中人参皂苷与生态因子的相关性及其生态区划[J]. 植物生态学报, 2012, 36(4): 302-312.

[16] 张治安, 徐克章, 任跃英, 等. 光照条件对参株碳水化合物和人参皂甙含量的影响[J]. 吉林农业大学学报, 1994, 16(3): 15-17.

[17] 王红星, 乔传英, 古红梅. 影响植物次生代谢产物形成的因素[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(35): 11376-11377.

[18] 包京姗, 王秀全, 金晶茹, 等. 不同土壤及其含水量对人参生长的影响[J]. 吉林农业大学学报, 2009, 31(6): 725-728.

[19] YU Q, WANG T. Simulation of the physiological responses of C3 plant leaves to environmental factors by a model which combines stomatal conductance, photosynthesis and transpiration[J]. Acta Bot Sin, 1998, 40(8): 740-750.

[20] KIM Y J, LEE O R, OH J Y, et al. Functional analysis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase encoding genes in triterpene saponin-producing ginseng[J]. Plant Physiol, 2014, 165(1): 373-387.

[21] PARK H W, KIM O T, HYUN D W, et al. Overexpression of farnesyl diphosphate synthase by introducing *CaFPS* gene in *Panax ginseng* C. A. Mey[J]. Korea Journal of Medicinal Crop Science, 2013, 21(1): 32-38.

[22] 蒋世翠, 张明哲, 王义, 等. 人参 *SQS* 基因的干扰载体构建及转化人参愈伤组织[J]. 吉林大学学报(理学版), 2011, 49(6): 1136-1140.

[23] HAN J Y, IN J G, KWON Y S, et al. Regulation of ginsenoside and phytosterol biosynthesis by RNA interferences of squalene epoxidase gene in *Panax ginseng*[J]. Phytochemistry, 2010, 71(1): 36-46.

[24] HAN J Y, KWON Y S, YANG D C, et al. Expression and RNA interference-induced silencing of the dammarenediol synthase gene in *Panax ginseng*[J]. Plant Cell Physiol, 2006, 47(12): 1653-1662.

[25] 刘娟, 纪瑞锋, 陈同, 等. 人参皂苷生物合成基因组织表达特性的研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(13): 2453-2459.

【责任编辑 庄 延】