

水杨酸对干旱胁迫下西洋参不定根生化指标和药用成分含量及相关基因表达的影响

卢超¹, 陈景鲜¹, 王国霞¹, 邓培渊^{1,2}, 李春阁¹, 孙晓童¹

(1 郑州师范学院 生命科学学院, 郑州 450000; 2 郑州市生物物种资源研究中心, 郑州 450000)

摘要: 为探讨西洋参不定根对干旱胁迫的应答机制及外源水杨酸(SA)对西洋参不定根抗旱性的影响, 本研究使用质量分数为 10% 的 PEG-6000 模拟干旱胁迫预处理, 然后添加不同浓度(0, 10, 40, 80 $\mu\text{mol/L}$)的外源 SA, 分别在处理 2、4、6、8 d 时检测西洋参不定根中抗氧化酶活性、渗透调节物质含量以及药用成分总黄酮、总皂苷、单体皂苷 Rb1 和 Re 的积累量, 并检测人参皂苷生物合成途径中相关合成和调控基因的表达量。结果显示: (1) 西洋参不定根中过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)活性以及游离脯氨酸含量均在 80 $\mu\text{mol/L}$ SA 处理 4 d 时出现峰值, 而丙二醛(MDA)含量在 40 $\mu\text{mol/L}$ SA 处理 4 d 时达到峰值。(2) 西洋参不定根中总黄酮的含量在 80 $\mu\text{mol/L}$ SA 处理 6 d 时达到最大值, 总皂苷和单体皂苷 Re 含量在 40 $\mu\text{mol/L}$ SA 处理 8 d 时达到最大值, 单体皂苷 Rb1 含量在 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 SA 处理 6 d 时达到最大值。(3) *Pq-HMGR* 和 *Pq-DS* 基因表达量在 40 $\mu\text{mol/L}$ SA 处理 2 d 时提高了 3 倍以上, *Pq-CYP6H*、*Pq-D12H*、*Pq-3-O-UGT1* 和 *Pq-bHLH25* 基因表达量在 40 $\mu\text{mol/L}$ SA 处理后提高了 1 倍以上。研究表明, 适宜浓度的外源 SA 可以有效改善西洋参不定根在干旱胁迫环境下的生理生化指标, 提高相关基因的表达量, 从而提高其抗旱能力和药用成分含量。

关键词: 西洋参; 干旱胁迫; 水杨酸; 生化指标; 药用成分; 基因表达

中图分类号: Q945.78; Q943.2

文献标志码: A

Effects of Salicylic Acid on Biochemical Indexes and Contents of Medicinal Components in Adventitious Roots of *Panax quinquefolius* under Drought Stress

LU Chao¹, CHEN Jingxian¹, WANG Guoxia¹, DENG Peiyuan^{1,2}, LI Chungel¹, SUN Xiaotong¹

(1 School of Life Science, Zhengzhou Normal University, Zhengzhou 450000, China; 2 Research Centre of Biological Species Resources, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: In this study, the response mechanism to drought stress and the effect of exogenous salicylic acid (SA) on the drought resistance of *Panax quinquefolius* L. adventitious roots were explored. The simulated drought stress was pretreated with 10% PEG-6000, and then exogenous SA at different concentrations (0, 10, 40, 80 $\mu\text{mol/L}$) were added to treat for 2, 4, 6 and 8 days, respectively. Then, the activity of antioxidant enzymes, the content of osmotic regulators, the accumulation of total flavonoids, total saponins, monomer saponins Rb1 and Re, expression of related synthesis and regulatory genes in the ginsenoside biosynthesis pathway were detected. The results showed that: (1) The activities of catalase (CAT) and per-

收稿日期: 2022-08-29; 修改稿收到日期: 2023-06-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(32000235); 河南省重点高校科研项目(22B360019); 郑州师范学院博士科研基金项目(501413); 郑州师范学院大学生科研创新基金项目(2021012)

作者简介: 卢超(1989—), 男, 博士, 讲师, 主要从事药食两用生物资源的开发与利用研究。E-mail: chaoluzznu@163.com

oxidase (POD) in adventitious roots both peaked when 80 $\mu\text{mol/L}$ SA treated for 4 days. The content of free proline reached the peak at 4 days after 80 $\mu\text{mol/L}$ SA treatment, and the content of malondialdehyde (MDA) reached the peak at 4 days after 40 $\mu\text{mol/L}$ SA treatment. (2) The content of total flavonoids in adventitious roots reached the maximum value when 80 $\mu\text{mol/L}$ SA treated for 6 days, and the content of total saponins and monomeric saponins Re reached the maximum value when treated with 40 $\mu\text{mol/L}$ SA for 8 days, the content of monomeric saponin Rb1 reached the maximum value at the 6 days of 80 $\mu\text{mol/L}$ SA treatment. (3) The expression levels of *Pq-HMGR* and *Pq-DS* genes were increased by more than 3 times on the second day after 40 $\mu\text{mol/L}$ SA treatment, and the gene expressions levels of *Pq-CYP6H*, *Pq-D12H*, *Pq-3-O-UGT1* and *Pq-bHLH25* were more than doubled after 40 $\mu\text{mol/L}$ SA treatment. These experimental results showed that the appropriate concentration of exogenous SA could effectively improve the physiological and biochemical indicators of adventitious roots of *P. quinquefolius* under drought stress, and increase the expression of related genes, thereby increasing its drought resistance and the content of medicinal components.

Key words: *Panax quinquefolius* L.; drought stress; salicylic acid; biochemical index; medicinal ingredient; gene expression

西洋参(*Panax quinquefolius* L.)为五加科人参属多年生草本植物,中医临床上常用于气虚阴亏、虚热烦倦等症,具有补气养阴、清热生津等功效^[1]。西洋参中有多种具有生物活性的化学成分类型,包括多糖类、皂苷类、有机酸类、黄酮类和挥发油类等^[1]。自1975年在北京等地引种成功以来,西洋参在中国多个省份已有大面积种植,中国已成为全球西洋参三大主产国之一^[2]。干旱胁迫是制约大多数药用植物产量和品质的一个重要逆境因素^[3-4]。在面对干旱胁迫时,这些植物往往会通过渗透调节物质的积累、提高抗氧化酶类活性和改变次生代谢产物合成等应答机制来减轻伤害,从而增强植物自身的抗旱性^[5]。如西洋参幼苗在遭受水分胁迫时,能通过提高体内脯氨酸含量,增强植株的抗氧化酶活性及抗氧化物含量共同来提高其抗胁迫能力^[6]。燕麦在重度干旱胁迫下,叶片中的丙二醛(MDA)含量以及超氧化物歧化酶(SOD)等抗氧化酶活性显著提高,叶片的总抗氧化能力增强^[7]。

邻羟基苯甲酸又称水杨酸(SA)是高等植物体内广泛存在的一类小分子酚类化合物,在植物生长过程中广泛参与相关生理代谢过程^[8]。作为一种内源性信号分子,许多研究表明SA在植物相应逆境信号胁迫和次生代谢产物生物合成过程中也发挥着重要作用^[8-10]。在干旱胁迫下,外源SA处理桔梗幼苗叶片中的抗氧化酶活性明显提高,MDA含量增加,说明外源SA能有效提高桔梗的抗旱能力^[4]。人参在春季和秋季喷施SA可以增加人参皂苷含量和植株的净光合速率,起到提高人参质量的目的^[11]。此外,添加外源水杨酸会导致西洋参发状根

中抗氧化酶活性发生明显变化,多个与人参皂苷合成的关键酶基因表达量上升,最终使得人参皂苷合成上调^[12]。但SA是否在参与西洋参调节抵御干旱胁迫的同时,会参与次生代谢产物积累和功能基因的调控,目前尚不清楚。结合本实验室前期已克隆的多个参与人参皂苷生物合成的关键酶基因,及可能参与次生代谢产物调控的转录因子,本研究用10%的PEG-6000模拟干旱胁迫,培养7 d后添加不同浓度的外源水杨酸处理,对不同处理下西洋参不定根中渗透调节物质的含量和保护酶活性进行比较,检测有效成分黄酮和皂苷类化合物的积累以及参与人参皂苷合成途径的关键酶基因和转录因子的基因表达量变化,为解析外源SA响应西洋参干旱胁迫调节的分子机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料和试剂

西洋参不定根为本实验室所诱导并传代^[13]。植物RNA提取试剂盒(9769)、反转录试剂盒(6210A)购自宝生物工程(大连)有限公司,荧光实时定量试剂盒(PC3302)购自北京艾德莱生物科技有限公司,PEG-6000和SA购于生工生物工程(上海)股份有限公司,人参皂苷Re(J10N11A130576)、人参皂苷Rb₁(G01O11Y126429)单体对照品购于上海源叶生物科技有限公司,纯度大于98%。乙腈、甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂为国产分析纯。

1.2 材料培养与处理

选取在23 $^{\circ}\text{C}$ 、110 r/min液体培养下生长良好

的西洋参不定根,振荡培养生长 21 d 后按每 100 mL 液体培养基 10 g 的比例添加 PEG-6000(质量分数为 10%)并培养 7 d。添加过滤除菌的 SA 使其终浓度分别为 0(S_0),10(S_{10}),40(S_{40}),80(S_{80}) $\mu\text{mol/L}$,每个浓度处理 3 瓶并重复 3 次,分别在 SA 处理 0,2,4,6,8 d 取不定根样品进行相关指标测定。处理结束后样品用无菌水冲洗并分为 3 份:一份吸干水分后进行脯氨酸、丙二醛(MDA)含量以及过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)活性检测;一份在 55 $^{\circ}\text{C}$ 条件下烘干至恒重进行黄酮和皂苷含量的测定;剩余一份用于 qRT-PCR 检测。

1.3 观测指标及方法

1.3.1 生理指标

取 0.5 g 不定根样品置于预冷研钵,加入 pH 7.0 磷酸盐缓冲液匀浆并用缓冲液定容到 5 mL,离心取上清为待测粗酶液。CAT 活性以 1 min 内 A_{240} 值下降 0.1 记为 1 个酶活性单位(U)。POD 活性用愈创木酚法进行测定,以 1 min 内 A_{470} 值改变 0.01 为 1 个酶活单位(U)。MDA 含量采用硫代巴比妥酸法进行测定。脯氨酸含量采用磺基水杨酸提取,用酸性茚三酮法进行测定。每个样本重复测定 3 次。

1.3.2 药用成分含量

将烘干的不定根粉碎经 60 目筛网过滤,脱脂脱色后,使用硝酸铝-亚硝酸钠-氢氧化钠法进行总黄酮含量测定^[14]。样品中总黄酮以芦丁当量(rutin

equivalent,RE)表示,单位为 mg RE/g DW。取 0.5 g 左右脱脂脱色后的不定根粉末,按 1 : 20 的比例加入水饱和正丁醇超声提取 1 h,蒸干滤液后用甲醇回溶,定容至 2 mL 进行皂苷含量测定。采用单体皂苷 Re 为标准品,使用香草醛-高氯酸-浓硫酸法进行样品中总皂苷的测定。采用高效液相法分析样品中单体皂苷 Re、Rb₁ 含量,色谱柱使用 Agilent ZORBAX SB-C18 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm),流动相使用 0.005% 甲酸水和 0.005% 甲酸乙腈,洗脱程序参加前期摸索方法^[13],检测波长为 203 nm,柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$,流速为 1.0 mL/min,每个样品重复测定 3 次。

1.3.3 qRT-PCR 检测基因表达量

提取不定根总 RNA 并通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测完整性,用微量核酸定量分析仪检测浓度。合成 cDNA,对内参 GAPDH、6 个西洋参中人参皂苷合成途径关键酶基因(*Pq-3-O-UGT2*、*Pq-3-O-UGT1*、*Pq-D12H*、*Pq-HMGR*、*Pq-DS*、*Pq-CYP6H*)和 2 个西洋参 bHLH 转录因子(*Pq-bHLH24* 和 *Pq-bHLH25*)进行 qRT-PCR 扩增。采用 20 μL 扩增体系,具体引物序列见表 1。反应程序采用 3 步法,进行 40 个循环,PCR 扩增结束后利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算转录因子的相对表达量,每个样本重复测定 3 次。

表 1 试验用到的引物
Table 1 Primers used for this experiment

基因名称 Gene name	Genbank 检索号 Genbank number	qRT-PCR 扩增引物 Primer used for qRT-PCR(5'→3')	目的片段大小 Product size/bp
<i>GAPDH</i>	MF614039.1	<i>GAPDH</i> -F:GCTATCAAGGAGGAGTCGGAGGG <i>GAPDH</i> -R:CTGGACAGATGCCATGTGAACAA	234
<i>Pq-HMGR</i>	FJ755158.2	<i>Pq-HMGR</i> -F:GGTTGCGTCTGTAATTTACCTCC <i>Pq-HMGR</i> -R:AATGATCTCCTCGTCTTCGTCTA	286
<i>Pq-DS</i>	KC316048.1	<i>Pq-DS</i> -F:GTGAAGCAGTTCGTAAGGGTGTT <i>Pq-DS</i> -R:CTAGCATAGCCCATGATGTTTGT	153
<i>Pq-CYP6H</i>	KC190491.1	<i>Pq-CYP6H</i> -F:GTTACGCAAACCTTCATCATTTCCC <i>Pq-CYP6H</i> -R:TACCTCCAGACGAGCAAACCTCAC	203
<i>Pq-D12H</i>	JX569336.1	<i>Pq-D12H</i> -F:AATGGACAGGGTGATGAAACAGT <i>Pq-D12H</i> -R:TATTTATAGGCACGGCAAGGAGT	200
<i>Pq-3-O-UGT1</i>	KR028477.1	<i>Pq-3-O-UGT1</i> -F:GCAAAGAACAAATGGCTACCCCTG <i>Pq-3-O-UGT1</i> -R:TCTTCAATTTCCCTAAGCGAGCA	164
<i>Pq-3-O-UGT2</i>	KR106207.1	<i>Pq-3-O-UGT2</i> -F:TCTCATGCTCCCACTCAGAAACG <i>Pq-3-O-UGT2</i> -R:GCTGCTGCCGTGGTTAGGAAATA	171
<i>Pq-bHLH24</i>	OK396631	<i>Pq-bHLH24</i> -F:ACCATTGACAACAATAGCAGCAC <i>Pq-bHLH24</i> -R:ATCAGAAACCCCTAATCACAAACATC	258
<i>Pq-bHLH25</i>	OK396632	<i>Pq-bHLH25</i> -F:ACCCTAACAGTAGCACTACCACAA <i>Pq-bHLH25</i> -R:TCTTCTTCACGAACCCCTAATCAC	264

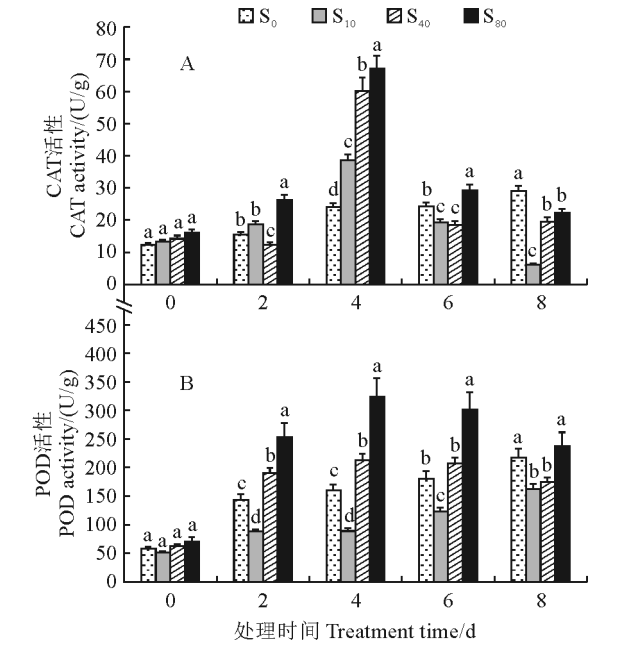
1.4 数据处理

使用 Excel 2019 进行数据整理,利用 SPSS 22.0 对数据进行统计与显著性分析,后期使用 Photo-shop CC 进行图片排版处理。

2 结果与分析

2.1 外源 SA 对 PFG-6000 胁迫下西洋参不定根抗氧化酶活性的影响

首先,在 PFG-6000 模拟的干旱胁迫下,随着处理时间的延长,西洋参不定根中的 CAT 活性在 S_0 处理下呈缓慢上升趋势,在第 8 天时约为 0 d 时的 1.37 倍,而在不同浓度的 SA 处理(S_{10} 、 S_{40} 、 S_{80})后总体均呈现先上升后下降的趋势,并均在 SA 处理第 4 天时达到最大值(图 1,A)。其中,在 SA 处理第 4 天时,西洋参不定根中 CAT 活性随着 SA 处理浓度的升高而增加($S_{80} > S_{40} > S_{10} > S_0$), S_{80} 分别是 S_{40} 、 S_{10} 、 S_0 的 1.12、1.74、2.79 倍。以上结果说明西洋参不定根中的 CAT 活性在各浓度外源 SA 处理第 4 天时均能得到明显提高,并以 80 $\mu\text{mol/L}$ SA 处理效果最佳。



S_0 、 S_{10} 、 S_{40} 、 S_{80} 分别表示 0、10、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的 SA 处理。同期不同小写字母表示处理之间在 0.05 水平存在显著性差异。下同。

图 1 外源 SA 处理对 PFG-6000 胁迫下西洋参不定根抗氧化酶活性的影响

S_0 、 S_{10} 、 S_{40} 、 S_{80} represent 0, 10, 40, 80 $\mu\text{mol/L}$ SA treatment, respectively. The different normal letters within same stage indicate significant difference among treatments at 0.05 level. The same as below.

Fig. 1 Effects of exogenous SA treatment on the activities of antioxidant enzymes in adventitious roots of *P. quinquefolius* under PFG-6000 stress

其次,在 PFG-6000 模拟的干旱胁迫下,随着处理时间的延长,西洋参不定根 POD 活性在 S_0 、 S_{10} 处理下均逐渐上升,而在 S_{80} 和 S_{40} 处理下均呈现先上升后下降的趋势,并均在处理第 4 天时达到最大值(图 1,B)。其中,不定根 POD 活性在 SA 处理 6 d 内始终表现为 $S_{80} > S_{40} > S_0 > S_{10}$,在处理第 8 天时则表现为 $S_{80} > S_0 > S_{40} > S_{10}$ 处理,即 S_{80} 处理始终最高, S_{10} 处理始终最低;在处理 4 d 时, S_{80} 处理分别是 S_{40} 、 S_0 、 S_{10} 处理的 1.52 倍、2.03 倍和 3.64 倍。这说明较高浓度的外源 SA 有利于增强干旱胁迫下西洋参不定根中的 POD 活性,但较低水平的外源 SA 反而有抑制作用。

2.2 外源 SA 对 PFG-6000 胁迫下西洋参不定根中 MDA 和游离脯氨酸含量的影响

由图 2,A 可知,随着干旱胁迫时间的增长,西洋参不定根中的游离脯氨酸含量在 S_0 处理中呈现缓慢上升趋势,而在 S_{80} 和 S_{40} 处理中始终高于同期 S_{10} 和 S_0 处理, S_{10} 处理除第 8 天外也均高于同期 S_0 ; S_{80} 处理游离脯氨酸含量在第 6 天时达到峰值 (29.08 $\mu\text{g/g}$),分别是 S_{40} 、 S_{10} 和 S_0 处理的 1.16 倍、1.49 倍和 2.45 倍。而在处理第 8 天时,3 个外源 SA 处理的游离脯氨酸含量都低于相应的第 6 天检测值,结果说明在 0~8 d 内添加 10~80 $\mu\text{mol/L}$ 的外源 SA 都可以增加西洋参不定根中的游离脯氨酸含量。

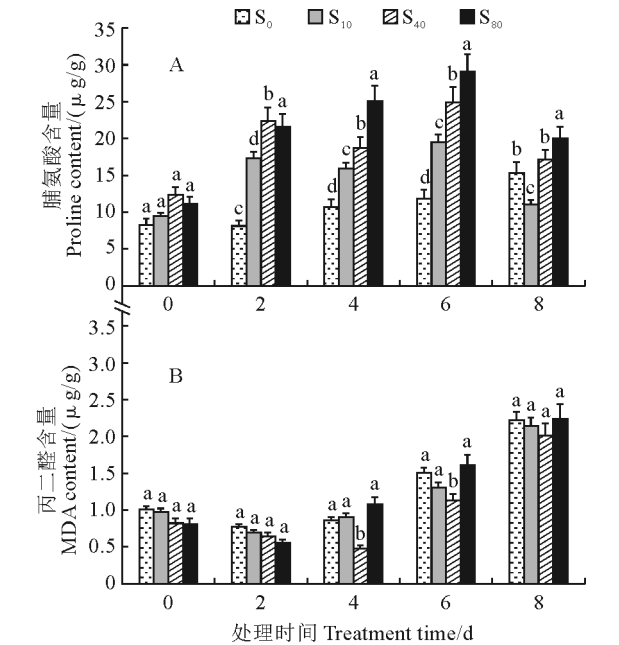


图 2 外源 SA 处理对 PFG-6000 胁迫下西洋参不定根中 MDA 和游离脯氨酸的影响

Fig. 2 Effects of exogenous SA treatment on the MDA and proline contents in adventitious roots of *P. quinquefolius* under PFG-6000 stress

同时,图 2,B 显示,当不同浓度的外源 SA 处理后,西洋参不定根中的 MDA 含量均随着处理时间延长呈现先下降后上升的趋势,且同期处理之间大多比较接近。其中,在 SA 处理第 4 天时,不定根中的 MDA 含量在 S_{40} 处理中达到最低点($0.65\text{ }\mu\text{g/g}$),且与其余处理均存在显著差异;在 SA 处理第 4 天以后,各处理组 MDA 含量均呈现上升趋势,而 S_{80} 与 S_{10} 和 S_0 处理之间始终无显著差异。这一检测结果表明外源 $40\text{ }\mu\text{mol/L}$ SA 能有效降低干旱胁迫下西洋参不定根中膜脂过氧化物的积累,减少细胞氧化损伤。

2.3 外源 SA 对 PFG-6000 胁迫下西洋参不定根中黄酮和皂苷类物质的影响

首先,黄酮类化合物是植物中分布较广的一类重要次生代谢产物。在不同浓度的外源 SA 处理后,西洋参不定根中的黄酮含量总体都呈现上升趋势,并在处理 4~8 d 多与 S_0 差异显著(图 3,A)。其中,在处理到第 6 天时,西洋参不定根中黄酮含量表现为 $S_{80}>S_{40}>S_{10}>S_0$,各 SA 处理均与 S_0 差异

显著, S_{80} 处理不定根中黄酮含量达到峰值(1.22 mg/g),分别是同期 S_{40} 、 S_{10} 、 S_0 处理的 1.03 倍、1.22 倍和 1.32 倍,而 S_{80} 与 S_{40} 之间无显著差异。这说明外源 $40,80\text{ }\mu\text{mol/L}$ SA 处理第 6 天时能有效提高西洋参不定根中黄酮类物质的含量。

其次,人参皂苷是西洋参等人参属植物重要的药理活性物质。由图 3,B 可知,经过 $40\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的外源 SA 处理后, S_{40} 、 S_{10} 、 S_0 处理西洋参不定根中的总皂苷含量均随着处理时间延长呈现逐渐上升趋势,在处理第 8 天达到最大值,而 S_{80} 处理则在第 6 天达到最大值,第 8 天时有所降低;各浓度 SA 处理不定根中的总皂苷含量在第 4~8 天均显著高于同期 S_0 ($P<0.05$),并表现为 $S_{40}>S_{80}>S_{10}>S_0$ 。其中, S_{40} 处理总皂苷含量在第 8 天时达到最高点(33.16 mg/g),并显著高于其余处理,是此时 S_0 的 1.25 倍。以上结果说明添加外源 SA 可显著提高西洋参不定根中总皂苷含量,但 $80\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的外源 SA 长时间处理时促进效应降低。

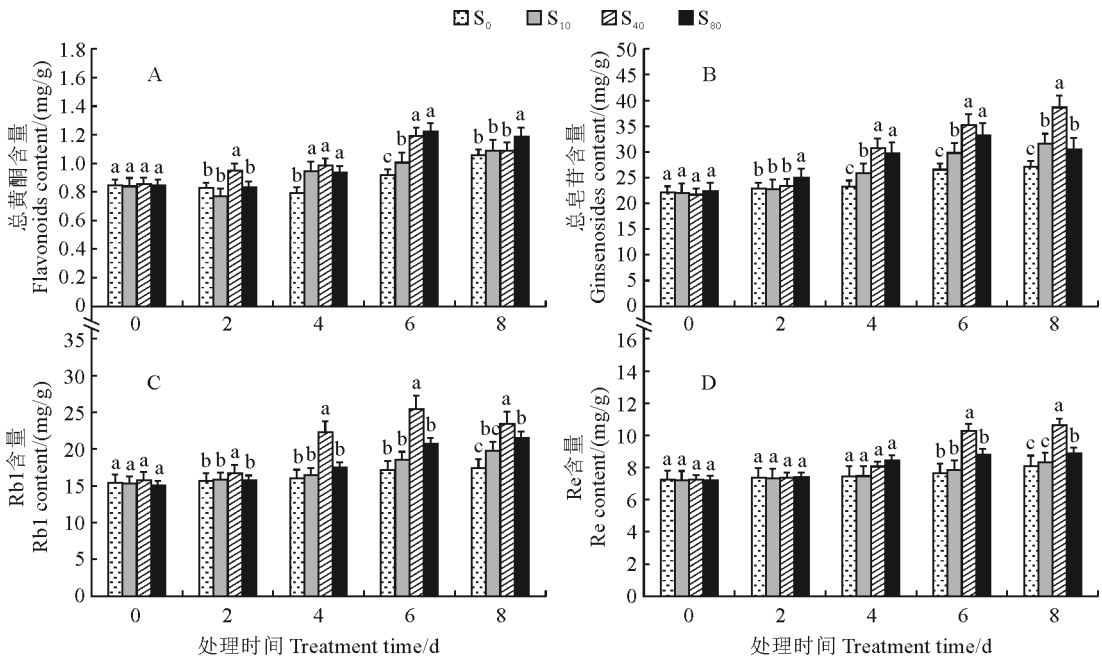


图 3 外源 SA 处理对 PFG-6000 胁迫下西洋参不定根中黄酮和皂苷类物质含量的影响

Fig. 3 Effects of exogenous SA treatment on the contents of flavonoids and ginsenosides in adventitious roots of *P. quinquefolius* under PFG-6000 stress

再次,单体皂苷 Rb1 和 Re 分别是西洋参中原人参二醇和原人参三醇型皂苷含量的代表。由图 3,C 可知,西洋参不定根中单体皂苷 Rb1 含量在 S_{40} 处理到第 4~8 天时均显著高于同期 S_0 和其余处理,并于第 6 天时达到最大值(25.42 mg/g),此时比 S_0 (17.21 mg/g) 显著提高 47.70% ($P<$

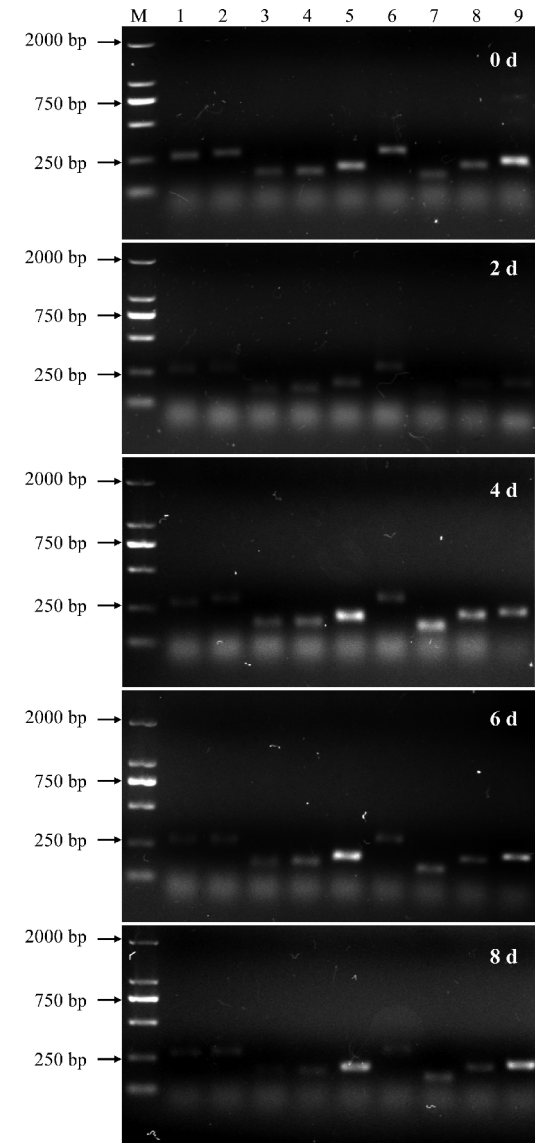
0.05); S_{80} 处理仅在第 8 天时显著高于 S_0 , S_{10} 处理则始终与 S_0 无显著差异。说明适量添加外源 SA 能够提高西洋参不定根中 Rb1 皂苷生物合成途径的能量流走向。而在第 8 天时, S_{40} 处理不定根的单体皂苷 Rb1 含量(23.44 mg/g)反而比第 6 天明显降低。这可能是由于 Rb1 皂苷继续参与西洋参中

其他原人参二醇型单体皂苷的生物代谢,因此并不能持续积累 Rb1 单体皂苷。不定根中单体皂苷 Re 含量在 S_{40} 处理到第 6~8 天显著高于同期 S_0 和其他处理,在第 8 天时达到最大值(10.62 mg/g); S_{80} 处理在第 4~6 天时显著高于 S_0 ($P<0.05$),而 S_{10} 处理始终与 S_0 无显著差异(图 3,D)。

2.4 外源 SA 对 PFG-6000 胁迫下西洋参不定根中皂苷代谢相关基因表达的影响

利用软件设计内参基因 *GAPDH*,6 个西洋参中人参皂苷合成途径关键酶基因(*Pq-3-O-UGT2*、*Pq-3-O-UGT1*、*Pq-D12H*、*Pq-HMGR*、*Pq-DS*、*Pq-CYP6H*)和 2 个西洋参 bHLH 转录因子(*Pq-bHLH24* 和 *Pq-bHLH25*)的开放阅读框进行 qRT-PCR 扩增。结果表明,扩增片段在 100~300 bp 之间,且引物扩增特异性良好;抽取 S_{80} 处理单次扩增结果进行核酸电泳检测,电泳结果也显示各引物的扩增效率良好,条带单一清晰(图 4)。

表 2 显示,3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGR)是植物体内萜类化合物生物合成过程中的重要关键酶,而达玛烯二醇合成酶(DS)是控制人参皂苷环化的关键酶。*Pq-HMGR* 基因相对表达量在 S_{10} 处理第 2,4 天以及 S_{40} 和 S_{80} 处理第 2 天都比 S_0 组显著升高,并在 S_{40} 处理第 2 天达到最大值,是 S_0 组的 3.11 倍,且与其余处理组和处理时间存在显著差异($P<0.05$)。*Pq-DS* 基因相对表达量在 S_{10} 处理第 2 天和及 S_{40} 处理第 2,4 天都比 S_0 组显著升高,并在 S_{40} 处理第 2 天达到最大值,是对照组的 3.74 倍,且与其余处理组和处理时间存在显著差异($P<0.05$)。*HMGR* 和 *DS* 基因表达量的显著升高,说明代谢流的明显增加,进而促进了人参皂苷的生物合成。同时,*Pq-CYP6H* 和 *Pq-D12H* 是 CYP450 基因家族控制羟基化反应的关键酶基因。*Pq-CYP6H* 基因相对表达量在 S_{10} 和 S_{80} 处理第 2 天以及 S_{40} 处理第 2 天都比 S_0 组显著升高,并在 S_{40} 处理第 2 天达到最大值,是 S_0 组的 1.55 倍;*Pq-D12H* 基因表达量仅在 S_{40} 处理第 2 天都比 S_0 组显著升高,是对照组的 1.78 倍,都与其处理组合处理时间存在显著差异($P<0.05$)。另外,糖基转移酶 *Pq-3-O-UGT1* 基因的转录水平在 S_{10} 、 S_{40} 和 S_{80} 处理第 2 天都比 S_0 组显著升高,并在 S_{80} 处理到第 2 天时达到最大值,是 S_0 组的 1.64 倍,说明 *Pq-3-O-UGT1* 基因收到 SA 信号时存在应答影响;而 *Pq-3-O-UGT2* 基因在受到 SA 刺激时,并未表现出明显的转录水平升高。



M. DL2000 分子量标准;1. *Pq-bHLH24*;2. *Pq-bHLH25*; 3. *Pq-3-O-UGT2*;4. *Pq-3-O-UGT1*;5. *Pq-D12H*; 6. *Pq-HMGR*;7. *Pq-DS*;8. *Pq-CYP6H*;9. *GAPDH*。

图 4 S_{80} 处理单次 qRT-PCR 扩增结果电泳图
M. DL2000 maker; 1. *Pq-bHLH24*; 2. *Pq-bHLH25*; 3. *Pq-3-O-UGT2*; 4. *Pq-3-O-UGT1*; 5. *Pq-D12H*; 6. *Pq-HMGR*; 7. *Pq-DS*; 8. *Pq-CYP6H*; 9. *GAPDH*。

Fig. 4 Electrophoresis results of single qRT-PCR amplification results in S_{80} treatment group

此外,外源添加 SA 后,转录因子 *Pq-bHLH25* 存在应答响应,在 S_{10} 和 S_{40} 处理诱导到第 2 天时达到最大值,是 S_0 组的 1.71 倍,显著高于其余处理组合处理时间;而 *Pq-bHLH24* 基因的转录水平虽然在 S_{40} 处理诱导到第 2 天时有最大值,但变化并不显著($P>0.05$)。西洋参不定根中皂苷代谢相关基因表达量在不添加 SA 条件下(S_0)始终无显著变化。可

见,西洋参不定根中皂苷代谢相关基因 *Pq-HMGR*、*Pq-DS*、*Pq-CYP6H*、*Pq-D12H*、*Pq-3-O-UGT1* *Pq-bHLH25* 相对表达量大多在外源 40 $\mu\text{mol/L}$ SA 处

理第 2 天时达到最大值,显著高于其余处理组合处理时间,*Pq-3-O-UGT2*、*Pq-bHLH24* 表达量则无显著变化。

表 2 外源 SA 处理对 6 个关键酶基因和 2 个转录因子基因表达量的影响

Table 2 Effects of exogenous SA treatment on the expression of 6 key enzyme genes and 2 transcription factor genes

处理 Treatment	天数 Days/d	基因名 Gene name							
		<i>Pq-HMGR</i>	<i>Pq-DS</i>	<i>Pq-CYP6H</i>	<i>Pq-D12H</i>	<i>Pq-3-O-UGT1</i>	<i>Pq-3-O-UGT2</i>	<i>Pq-bHLH24</i>	<i>Pq-bHLH25</i>
S ₀	0	7.04±0.08a	5.22±0.21a	7.17±0.01a	4.13±0.16a	6.16±0.24a	4.57±0.22a	4.45±0.21a	5.82±0.23a
	2	7.85±0.07a	6.17±0.14a	7.47±0.01a	4.22±0.16a	5.92±0.34a	5.24±0.35a	4.65±0.26a	5.65±0.22a
	4	8.33±0.09a	4.77±0.19a	8.33±0.01a	5.43±0.21a	6.39±0.37a	5.14±0.40a	5.37±0.29a	6.06±0.24a
	6	7.97±0.11a	5.31±0.21a	8.45±0.01a	6.08±0.24a	6.12±0.48a	4.94±0.44a	5.65±0.34a	5.11±0.20a
	8	8.22±0.08a	5.18±0.21a	8.66±0.02a	5.27±0.21a	7.32±0.45a	5.04±0.45a	4.92±0.31a	5.95±0.23a
S ₁₀	0	7.12±0.08b	5.22±0.18b	7.22±0.01b	4.25±0.17a	5.91±0.23b	4.25±0.21a	5.75±0.23a	5.16±0.20b
	2	18.53±1.38a	17.39±1.45a	9.59±1.05a	6.05±0.24a	7.73±0.84a	4.71±0.18a	7.75±0.61a	9.52±0.93a
	4	10.02±1.06a	8.91±0.43b	8.59±0.06b	4.82±0.19a	6.59±0.26b	5.37±0.41a	5.86±0.43a	8.82±0.47b
	6	7.49±0.17b	6.24±0.36b	7.47±0.09b	3.18±0.12a	5.46±0.61b	5.61±0.53a	5.19±0.16a	4.65±0.18b
	8	7.67±0.11b	4.42±0.17b	7.85±0.03b	2.35±0.09a	6.98±0.35b	5.69±0.33a	6.68±0.14a	4.71±0.18b
S ₄₀	0	7.84±0.07b	5.22±0.18c	7.31±0.01b	3.78±0.15b	5.88±0.23b	3.97±0.19a	5.13±0.20a	5.42±0.21b
	2	24.44±2.47a	23.11±2.52a	11.59±1.45a	9.68±1.38a	9.41±1.09a	5.93±0.19a	8.72±0.50a	9.74±0.86a
	4	12.21±1.48b	14.26±1.33b	8.62±0.02a	8.36±0.33b	6.45±0.13b	4.71±0.23a	5.58±0.53a	7.81±0.59b
	6	8.64±0.34b	8.71±0.26c	7.60±0.02b	4.82±0.19b	5.99±0.39b	5.41±0.32a	4.47±0.13a	5.62±0.22b
	8	7.42±0.09b	6.69±0.26c	7.27±0.13b	2.16±0.08b	6.03±0.40b	5.56±0.32a	5.04±0.12a	3.92±0.15b
S ₈₀	0	7.01±0.08b	5.22±0.19a	7.20±0.01b	3.45±0.13a	6.06±0.24b	4.55±0.22a	5.39±0.21a	5.77±0.23a
	2	13.90±1.55a	10.63±1.42a	9.59±0.95a	7.53±0.38a	9.73±0.94a	4.31±0.21a	6.32±0.17a	8.74±0.58a
	4	8.22±0.45b	8.83±0.27a	7.48±0.05a	7.69±0.30a	6.82±0.52b	5.64±0.28a	5.79±0.39a	7.21±0.46a
	6	7.21±0.21b	6.41±0.25a	7.74±0.02b	5.25±0.21a	5.78±0.51b	5.32±0.46a	5.86±0.61a	5.19±0.44a
	8	8.14±0.16b	4.51±0.18a	6.44±0.09b	3.59±0.06a	6.02±0.72b	5.62±0.43a	6.25±0.49a	4.28±0.17a

注:同列不同小写字母表示某基因在同一处理组不同时间的表达量有显著性差异($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference in the expression of a gene among different time points at 0.05 levels in the same treatment group ($P<0.05$).

3 讨 论

许多研究表明,水分、温度、光照和激素等非生物信号在人参属植物的生长发育和药用成分的生物合成过程中发挥着重要作用^[15-16]。在本研究不加 SA 的对照组实验数据中显示,低浓度的 PEG 模拟干旱会导致西洋参不定根中的抗氧化酶 POD 和 CAT 活性缓慢上升。这是由于植物体内的抗氧化酶类活性在植物受到胁迫情况下受到诱导增强,通过清除自由基等方式来保护膜系统,从而缓解胁迫作用。这与高岩等用 PEG 模拟干旱胁迫处理人参愈伤组织时,愈伤组织鲜重随干旱胁迫的加剧而明显抑制结论相一致,说明干旱胁迫会对西洋参正常生长产生不利影响^[17]。SA 是植物体内广泛存在并在多种植物中参与逆境胁迫调节和次生代谢产物的

生物合成过程^[18]。在桔梗幼苗遭遇干旱胁迫时,外源 SA 可以显著提高幼苗叶片和根中的抗氧化酶活性,以减轻干旱对桔梗幼苗的危害^[4]。本研究也发现经过 80 $\mu\text{mol/L}$ 的 SA 处理西洋参不定根第 4 天时,其 CAT 和 POD 活性分别是未经 SA 处理对照的 2.79 倍和 2.03 倍。除了抗氧化酶活性有明显变化,西洋参不定根中的渗透调节物质也对 SA 信号产生响应。本试验在添加不同浓度 SA 后,不定根中 MDA 的含量出现了先下降后上升的趋势,而脯氨酸的含量呈现了先上升后下降的趋势;在 40 $\mu\text{mol/L}$ SA 处理到第 4 天时,MDA 的含量达到检测值的最低点,说明 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 SA 可以减少细胞的损伤。这与其他研究中低浓度外源 SA 可缓解干旱胁迫造成的伤害的结论^[5]相一致。

任春林等发现 SA 能提高白桦悬浮细胞中齐墩

果酸的含量^[19],梁莹在西洋参发状根培养过程中添加 0.001 mg/L SA,培养 5 d 时人参皂苷含量是对照组的 1.2 倍^[12]。在本试验中,西洋参不定根中的总黄酮、总皂苷、单体皂苷 Rb1 和 Re 含量在 SA 处理后都出现了最大值,说明 SA 在调节不定根内抗氧化酶和渗透调节物质的同时,也会参与调节体内次生代谢产物的积累。王晨等研究发现非生物信号刺激下,北柴胡根内 JA 等信号物质含量增加,促进调节基因 *BcMYC2* 的表达,进而提高柴胡皂苷生物合成途径中关键酶基因的表达,最终显著增加柴胡皂苷的含量^[20]。本研究中 qRT-PCR 实验结果也显示 *HMGR* 和 *DS* 等关键酶基因的表达量在外源 40 $\mu\text{mol/L}$ SA 处理第 2 天均显著上升,这与梁莹等的研究结果^[12] 相一致。由此推测,次级代谢产物的积累量增加可能是由于 SA 调控这些化合物生物合成中的关键酶基因表达量、转录因子及启动子活性等

方式,继而影响到西洋参不定根体内代谢流的走向。在笔者其他在研项目中还发现这些编码基因上游存在着 SA 响应元件,暗示它们之间可能存在相互影响和促进,在植物激素诱导时进行协同交互响应,但具体的调控通路和机制仍需进一步研究。

综上所述,在干旱胁迫条件下,外源 SA 处理可有效提高西洋参不定根中抗氧化酶 CAT 和 POD 的活性,有利于游离脯氨酸的积累和 MDA 含量的降低,缓解干旱胁迫对西洋参不定根的伤害。40 $\mu\text{mol/L}$ 的外源 SA 处理有利于西洋参不定根中有效成分总黄酮、总皂苷和单体皂苷 Rb1 和 Re 含量的积累,并促使参与人参皂苷合成途径的 *HMGR* 等关键酶基因的表达量显著升高。因此,适宜浓度的外源 SA 可以改善西洋参不定根在干旱胁迫环境下的生长状态,缓解干旱胁迫,促进药用有效成分积累。

参考文献:

[1] 吴首蓉,郭晓宇,屠鹏飞,等. 西洋参化学成分、生物活性、品质评价及产品开发生研究进展[J]. 药学学报, 2022, **57**(6): 1 711-1 725.
WU S R, GUO X Y, TU P F, *et al.* Research progress on chemical constituents, biological activities, quality evaluation, and product development of *Panax quinquefolius* [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2022, **57**(6): 1 711-1 725.

[2] 初 侨,席兴军,王鹤妍,等. 中韩人参产业标准化程度对比分析研究[J]. 中国中药杂志, 2017, **42**(10): 1 996-2 000.
CHU Q, XI X J, WANG H Y, *et al.* Comparative analysis on industrial standardization degree of Chinese and Korean ginseng[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2017, **42**(10): 1 996-2 000.

[3] 石艳华,张永清,罗海婧. 化学调节物质浸种对不同水分条件下苦荞生长及其生理特性的影响[J]. 西北植物学报, 2013, **33**(1): 123-131.
SHI Y H, ZHANG Y Q, LUO H J. Influence of seed soaking with chemical regulators on the growth and physiological characteristics of tartary buckwheat in different water conditions [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2013, **33**(1): 123-131.

[4] 孙晓春,黄文静,李 铂. 水杨酸对干旱胁迫下桔梗幼苗生理生化指标及相关基因表达的影响[J]. 中国农业科技导报, 2022, **24**(1): 63-70.
SUN X C, HUANG W J, LI B. Effects of exogenous salicylic acid on physiological and biochemical indexes and related gene expression in *Platycodon grandiflorus* under drought stress [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2022, **24**(1): 63-70.

[5] 王 帆,桑晓华,谷 巍,等. 外源水杨酸对干旱胁迫下茅苍术光合参数和抗氧化酶活性的影响[J]. 分子植物育种, 2020, **18**(9): 3 060-3 067.
WANG F, SANG X H, GU W, *et al.* Effects of salicylic acid on photosynthetic characteristics and physiological indexes of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. under drought stress[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2020, **18**(9): 3 060-3 067.

[6] 张淋淋,孙 海,于红霞,等. 水分胁迫对西洋参叶片生理生化指标的影响[J]. 吉林农业大学学报, 2020, **42**(4): 403-408.
ZHANG L L, SUN H, YU H X, *et al.* Effects of water stress on physiological and biochemical indexes of *Panax quinquefolius* leaves[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2020, **42**(4): 403-408.

[7] 李英浩,刘景辉,米俊珍,等. 重度干旱胁迫下燕麦叶片活性氧清除系统对喷施腐植酸水溶肥的响应[J]. 西北植物学报, 2022, **42**(5): 803-810.
LI Y H, LIU J H, MI J Z, *et al.* Response of active oxygen scavenging system in oat leaves to humic acid water-soluble fertilizer application under severe drought stress[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2022, **42**(5): 803-810.

[8] 代红洋,柏 旭,李晓岗,等. 植物激素在三萜类化合物生物合成中的作用及调控机制研究进展[J]. 中草药, 2021, **52**(20): 6 391-6 402.
DAI H Y, BAI X, LI X G, *et al.* Research progress on roles of phytohormone in biosynthesis of triterpenoids and their regulatory mechanisms [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2021, **52**(20): 6 391-6 402.

[9] 张雪蒙,亢 超,滕元旭,等. 外源硫化氢和水杨酸对盐胁迫下

加工番茄幼苗生长与生理特性的影响[J]. 西北植物学报, 2022, **42**(2): 255-262.

ZHANG X M, KANG C, TENG Y X, *et al.* Effects of exogenous hydrogen sulfide and salicylic acid on growth and physiological characteristics of processing tomato seedlings under salt stress[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2022, **42**(2): 255-262.

[10] 甘红豪,赵 帅,高明远,等. 外源水杨酸对 NaCl 胁迫下白榆幼苗光合作用及离子分配的影响[J]. 西北植物学报, 2020, **40**(3): 478-489.

GAN H H, ZHAO S, GAO M Y, *et al.* Effect of salicylic acid on photosynthesis and ion distribution of *Ulmus pumila* seedlings under NaCl stress[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2020, **40**(3): 478-489.

[11] 曹伍林,孟祥才,马 伟. 水杨酸对春季全光照下人参光合特性、生理生化及皂苷含量的影响[J]. 中国中药杂志, 2015, **40**(18): 3 553-3 559.

CAO W L, MENG X C, MA W, Effect of salicylic acid on photosynthesis, physio-biochemistry and quality of *Panax ginseng* under full sun shine in spring[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2015, **40**(18): 3 553-3 559.

[12] 梁 莹. 诱导子调控下西洋参发状根皂苷合成相关基因表达研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014.

[13] 陈景鲜,卢 超,郑钧屏,等. 西洋参中 8 个 bHLH 类转录因子的克隆及表达分析[J]. 中国中药杂志, 2022, **47**(14): 3 756-3 764.

CHEN J X, LU C, ZHENG J P, *et al.* Cloning and expression analysis of 8 bHLH transcription factors in *Panax quinquefolius*[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2022, **47**(14): 3 756-3 764.

[14] 卢 超,陈景鲜,王国霞,等. 基于 AHP-CRITIC 的 D-最优混料设计优化一款金银花茶饮[J]. 中国食品添加剂, 2022, **33**(7): 144-151.

LU C, CHEN J X, WANG G X, *et al.* Optimization of a honeysuckle tea by D-optimal mixture design based on AHP-CRITIC analysis[J]. *China Food Additives*, 2022, **33**(7): 144-151.

[15] 马文琪,王红阳,张文晋,等. 生态因子对人参外形和皂苷类成分的影响[J]. 中国中药杂志, 2021, **46**(8): 1 920-1 926.

MA W Q, WANG H Y, ZHANG W J, *et al.* Effects of ecological factors on shape and ginsenoside of *Panax ginseng* [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2021, **46**(8): 1 920-1 926.

[16] 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.

YANG L L, ZHANG T, YANG L M, *et al.* Correlation analyses of ecological factors, ginsenoside contents and expression of associated key enzymes in *Panax ginseng* leaves[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2018, **39**(3): 39-47.

[17] 高 岩,张 涛,杨利民,等. 聚乙二醇胁迫对人参愈伤组织皂苷合成及关键酶基因表达量的影响[J]. 吉林农业大学学报, 2020, **42**(4): 395-402.

GAO Y, ZHANG T, YANG L M, *et al.* Effects of PEG stress on saponin synthesis and gene expression of key enzymes in *Panax ginseng* callus[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2020, **42**(4): 395-402.

[18] 苏金龙,王小璐,李素方,等. 水杨酸延缓猕猴桃果实采后衰老与精氨酸分解代谢的关系[J]. 西北植物学报, 2020, **40**(10): 1 714-1 721.

SU J L, WANG X L, LI S F, *et al.* Relationship between salicylic acid delaying postharvest senescence and arginine catabolism in kiwifruit[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2020, **40**(10): 1 714-1 721.

[19] 任春林,尹 静,潘亚婕,等. 水杨酸对白桦悬浮细胞中齐墩果酸积累及防御酶活性的影响[J]. 中草药, 2012, **43**(5): 972-977.

REN C L, YIN J, PAN Y J, *et al.* Effects of salicylic acid on accumulation of oleanolic acid and defense enzyme activity in suspension cells of *Betula platyphylla* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2012, **43**(5): 972-977.

[20] 王 晨,胡珊群,李 彤,等. 模拟干旱胁迫处理下北柴胡种苗 MYC₂ 基因的调控研究[J]. 西北植物学报, 2021, **41**(10): 1 747-1 754.

WANG C, HU S Q, LI T, *et al.* Regulation of MYC₂ in *Bupleurum chinense* under simulated drought stress[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2021, **41**(10): 1 747-1 754.

(编辑:裴阿卫)