

低温胁迫对人参皂苷生物合成途径基因家族表达特性的影响研究

刘佳^{1,2}, 全雪丽¹, 姜明亮^{1,2}, 李翔国¹, 全林虎², 吴松权^{1,2*}

1. 延边大学农学院, 吉林 延吉 133002

2. 延边大学 长白山生物资源与功能分子教育部重点实验室, 吉林 延吉 133002

摘要: **目的** 研究低温胁迫对人参皂苷生物合成途径的 3 个基因家族 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶 (PgHMGR)、鲨烯合酶 (PgSS)、鲨烯环氧酶 (PgSE) 的影响, 探讨各个家族成员响应低温的机制, 并推测出响应低温的关键家族基因。**方法** 将 3 周大的新鲜人参愈伤组织放置在 5 °C 的冰箱中, 分别在 0、0.5、1、2、3 d 后进行取样, 分别记作 CK、D1、D2、D3、D4, 进行 RNA 提取和反转录实验, 实时荧光定量 PCR 检测低温胁迫处理下不同基因的表达量。**结果** PgHMGR1 的表达量在 D3 时期达到对照组的 1.3 倍, PgHMGR2 的表达量在 D1 时期达到峰值, 为对照组的 3.8 倍; PgSS1 的表达量在 D3 时期达到对照组的 1.7 倍; PgSE1 和 PgSE2 的表达量均在 D1 时期分别达到对照组的 6.9 倍和 6 倍。其他家族基因 (PgHMGR3、PgSS2、PgSE3) 的表达量均无显著性变化。**结论** 人参皂苷生物合成途径各个基因家族积极响应低温胁迫处理, 推测 PgHMGR1、PgHMGR2、PgSS1、PgSE1 和 PgSE2 是人参愈伤组织响应低温胁迫时的关键家族基因。

关键词: 人参; 人参皂苷; 低温胁迫; 基因家族; 表达特性; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)11-1956-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.11.024

Effect of cold stress on expression characteristic of gene families of ginsenoside biosynthesis pathway

LIU Jia^{1,2}, QUAN Xue-li¹, JIANG Ming-liang^{1,2}, LI Xiang-guo¹, QUAN Lin-hu^{1,2}, WU Song-quan^{1,2}

1. Agricultural College of Yanbian University, Yanji 133002, China

2. Key Laboratory of Natural Resources of Changbai Mountain & Functional Molecules, Ministry of Education, Yanbian University, Yanji 133002, China

Abstract: Objective To investigate the effect of cold stress on the three gene families (PgHMGR, PgSSs, and PgSEs) of the ginsenoside biosynthetic pathway, and to explore the mechanism of genes response to cold stress and find the key genes. **Methods** The cold stress treatment was performed by selecting 3 weeks fresh callus which placed in the 5 °C refrigerator, and harvested after 0, 0.5, 1, 2, and 3 d treatment for further analysis, were recorded as CK, D1, D2, D3, and D4, respectively. **Results** The expression of PgHMGR1 reached 1.3 times compared to the control group at D3 period, and the expression of PgHMGR2 reached the peak at D1 period, which was 3.8 times of the control group; the expression of PgSS1 was 1.7 times of the control group (D3 period); and the expressions of PgSE2 and PgSE1 were 6.9 and 6 times higher than those of the control group, respectively. There was no significant change of the expression of PgSS2, PgSE3, and PgHMGR3. **Conclusion** The gene families of ginsenoside biosynthesis pathway positively response to cold stress treatment, and PgHMGR1, PgHMGR2, PgSS1, PgSE1, and PgSE2 may be the key family genes when *Panax ginseng* callus response to cold stress.

Key words: *Panax ginseng* C. A. Meyer; ginsenoside; cold stress; gene family; expression characteristic; RT-PCR

人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 在中国被发现已经超过 5 000 年, 其干燥根被视为具有高价值的中药材^[1]。人参皂苷被认为是人参中重要的生物活性物质, 并且人参皂苷的药理活性和结构已经被广

泛研究^[2], 主要包括抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗疲劳和调节免疫等方面^[3]。普遍认为人参皂苷的合成起始于 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶 (PgHMGR) 限速调控的甲羟戊酸途径 (MVA 途径)^[4], 而后经过

收稿日期: 2015-11-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21462044)

作者简介: 姜明亮 (1990—), 男, 硕士在读, 研究方向为植物生物技术。E-mail: jml005@163.com

*通信作者 吴松权 (1972—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事植物种质等研究工作。E-mail: arsqw@ybu.edu.cn

一系列酶的协同作用最终生成人参皂苷, 主要的酶类包括法尼基焦磷酸合成酶 (PgFPS)、鲨烯合酶 (PgSS)、鲨烯环氧酶 (PgSE)、达玛烷二醇合酶 (PgDS) 等^[5], 其中 PgHMGR、PgSS 和 PgSE 均由多个家族基因编码, 并被认为是影响人参皂苷量和响应生物、非生物胁迫的关键酶^[6]。

人参主要分布在中国、韩国和西伯利亚东部, 并且栽培人参大多生长在北半球^[7-8]。人参通常生长在较为凉爽的地方, 年平均温度在 3.3~7.3 °C, 表明低温胁迫每年都会频繁地影响人参的生长^[9]。低温胁迫被认为是最重要的非生物胁迫, 影响着植物生长、发育和作物产量^[10]。合理且有效地利用低温胁迫能增加人参皂苷量, 并且皂苷量通常在经受低温胁迫后提高, Oh 等^[6]研究表明低温胁迫显著增加了三年生人参须根中总皂苷的量。虽然低温胁迫增加人参皂苷量的研究已经被报道, 但是研究低温胁迫对人参皂苷生物合成途径基因家族表达特性的影响还未见报道。本实验以人参愈伤组织为材料, 研究了低温胁迫对人参皂苷生物合成途径 3 个关键基因家族 (PgHMGR、PgSS、PgSE) 表达特性的影响, 为以后研究利用基因表达调控人参皂苷量提供依据, 同时也为研究低温下人参皂苷生物合成途径基因家族中的关键家族成员奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

本实验的人参愈伤组织取自汪清人参栽培基地, 直接由人参根诱导产生。人参药材经延边大学农学院植物学教研室石铁源教授鉴定为人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer。人参愈伤组织培养方法主要参照 Xu 等^[11]的报道。人参愈伤组织保持在含有 1% 琼脂和 3% 蔗糖的 67-V 培养基上, 并加入 1.5 mg/L 的二氯苯氧乙酸 (2,4-D), pH 值调整为 5.8, 并在 25 °C 下暗培养。

1.2 药品与试剂

Trizol 购自美国 Life Technology 公司; 反转录试剂盒购自 Toyobo 公司; SYBR Green 试剂盒购自 Takara 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器

Mx3005P 荧光定量 PCR (美国 Agilent 公司); TC-412PCR 仪 (英国 Techne 公司); CR22GIII 高速离心机 (日本 Hitachi 公司); C1301-B-230V 手掌型迷你离心机 (美国 Labnet 公司); 电子天平 (上海

精密科学仪器有限公司); 超低温冰箱 (日本 Sanyo 公司); BCD-186JV 冷藏冷冻一体冰箱 (中国星星集团)。

2 方法

2.1 取材

选取生长 3 周的新鲜人参愈伤组织 (5 g) 用于低温胁迫实验。首先将所有样品放置在 5 °C 的冰箱中, 分别在 0、0.5、1、2、3 d 进行取样, 分别记作 CK、D1、D2、D3、D4, 用液氮冷冻后储存于超低温冰箱中待用。

2.2 实时荧光定量 PCR

取 1 g 人参愈伤组织, 严格按照 Trizol 说明书提取 RNA, 然后按照反转录试剂盒要求进行反转录。实时荧光定量 PCR 每个反应体积中利用 100 ng 的 cDNA 进行实验, 采用 SYBR 染料法, 热循环条件设置如下: 95 °C、10 min, 95 °C、10 s, 60 °C、10 s, 72 °C、20 s, 共 40 个循环, 绘制熔解曲线, 每个循环的最后一步检测荧光信号, 内参基因 β -actin 和特异引物序列见表 1。为了确定每个样品中模板峰度的差异, 将每个基因的特异引物 Ct 值和内参基因的 Ct 值进行均一化, 然后利用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算出相对值, 每个样品均重复 3 次。

2.3 统计分析

统计分析采用 SPSS 19.0 软件, 数据的显著性利用 ANOVA 计算, 个体比较利用 Duncan 多范围检验 ($P < 0.05$)。

3 结果

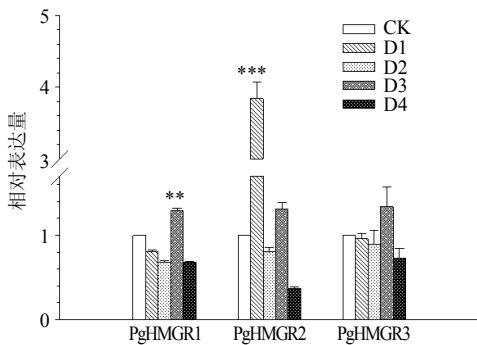
3.1 低温胁迫对 PgHMGR 基因表达的影响

利用实时荧光定量 PCR 评估了低温胁迫下 PgHMGR 基因 (PgHMGR1、2、3) 的表达水平。图 1 中结果表明 PgHMGR1 的表达水平在 D1 和 D2 时期均显著低于对照组, 随着低温处理时间的增加, 在 D3 时期达到峰值, 为对照组的 1.3 倍 ($P < 0.01$), 随后又下降到正常水平以下。相反, PgHMGR2 的表达却非常迅速, 在 D1 时期即出现峰值, 是对照组的 3.8 倍 ($P < 0.001$), 但持续时间短暂, 在 D2 时期恢复到正常水平, 而后在 D3 时期有所增加, 但相对于对照组无显著差异, 最后在 D4 时期出现最小值。发现 PgHMGR3 表达水平的变化趋势与 PgHMGR1 的趋势一致, 都是在 D2 时期之前逐渐下降, 而后上升再下降, 唯一不同的是 PgHMGR3 的表达水平一直维持在正常水平上, 并无显著变化。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Sequences of primers for real-time RT-PCR

引物名称	序列	基因登录号
actin	正向引物: 5'-GAAAAGATTGGCATCACACCT-3' 反向引物: 5'-TCGGCTTGAATAGCAACATACAT-3'	AY907207
PgHMGR1	正向引物: 5'-TTGGATTGAAGGGCGAGGAAAAG-3' 反向引物: 5'-CAGCAACAGCAGAACCAGCAAG-3'	GQ455990
PgHMGR2	正向引物: 5'-CGCCTGATAGTTGGGACATTCTC-3' 反向引物: 5'-GCTGATTATGCTTTTGGGGAAC-3'	JX648390
PgHMGR3	正向引物: 5'-TGTGACAGGTATCTCTGGAAAT-3' 反向引物: 5'-CCATGTTAAGCTCTACAAGGGC-3'	GU565097
PgSS1	正向引物: 5'-AACCTGTCCAAAAGGAAATCA-3' 反向引物: 5'-TGGGGTTCTCACTGTTTGTTC-3'	AB115496
PgSS2	正向引物: 5'-TCTGGAGCCCTGACCACTAAA-3' 反向引物: 5'-GCAAAACCAATCACAGGCT-3'	GQ468527
PgSE1	正向引物: 5'-GAGAGAGTTGTAGATAGAGAGAGAGAAA-3' 反向引物: 5'-TGATCAATGAGCAGAGCTTCCA-3'	AB122078
PgSE2	正向引物: 5'-ATCATCTATTTAATTCATGGAATCGA-3' 反向引物: 5'-CCAGCACCACCTTTTTTCTCTCT-3'	FJ393274
PgSE3	正向引物: 5'-GGCATTGTAGAGAGAGACGTGA-3' 反向引物: 5'-GCAGAGCGCTAGCTTCCATAAA-3'	AB003516



与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下同
** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as below

图 1 低温胁迫下人参愈伤组织中 PgHMGR 基因家族相对表达量

Fig. 1 Relative expression levels of PgHMGR gene under cold stress of *P. ginseng* callus

3.2 低温胁迫对 PgSS 基因表达的影响

低温胁迫下 PgSS 基因 (PgSS1、PgSS2) 的相对表达量也利用实时荧光定量 PCR 进行评估。图 2 中的结果表明 PgSS1 的表达量在 D1 时期相对于对照组显著下降, 而后在 D2 时期略有增加, 但仍显著低于对照组, 直到 D3 时期达到峰值, 是对照组的 1.7 倍 ($P < 0.001$), 随后又减少到正常水平以下。

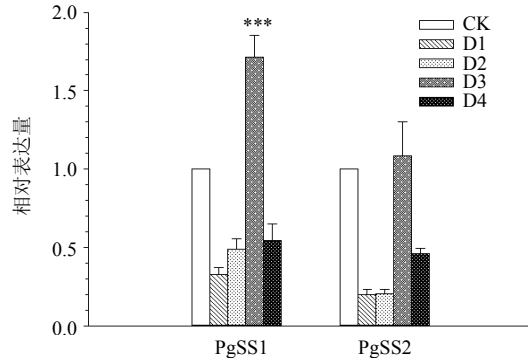


图 2 低温胁迫下人参愈伤组织中 PgSS 基因相对表达量
Fig. 2 Relative expression levels of PgSS gene under cold stress of *P. ginseng* callus

而它的家族成员 PgSS2 在低温胁迫下相对于对照组并未显著增加, 而且其表达量的变化趋势和 PgSS1 基本一致, 只是在 D3 时期略有不显著的增加。

3.3 低温胁迫对 PgSE 基因表达的影响

实时荧光定量 PCR 评估的 PgSE 基因表达水平见图 3。从图中可以看出, PgSE1 反应迅速, 在 D1 时期即达到峰值, 是对照组的 6.9 倍 ($P < 0.001$), 然而随着低温处理时间的增加, PgSE1 的表达量逐渐减少, 并且 D3、D4、D5 3 个时期均低于对照水平。PgSE2 的表达量变化趋势和家族成员 PgSE1

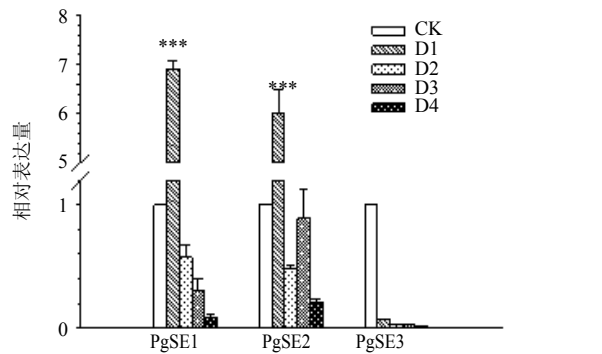


图 3 低温胁迫下人参愈伤组织中 PgSE 基因相对表达量
Fig. 3 Relative expression levels of PgSE under cold stress of *P. ginseng* callus

基本一致，也是在 D1 时期达到最大值，为对照组的 6 倍 ($P < 0.001$)，随后在 D2 时期下降，不同的是 PgSE2 的表达量在 D3 时期相对于 D2 时期有所增加，略低于对照组表达量，随后在 D4 时期相对于对照组显著减少。与前两者均相异的 PgSE3 在低温处理的 D1 时期便显著减少，随着处理时间的增加，PgSE3 的表达量在 D3 时期继续减少，并且一直持续到 D4 时期。

4 讨论

人参皂苷的合成是由多种基因及其家族成员共同作用完成的，这是一个受多因素调节的非常复杂的动态变化过程^[3]。此外，由于栽培人参主要生长于北半球，每年都会频繁的遭受各种非生物胁迫，这使得人参皂苷的合成途径变得更为复杂，其中低温胁迫是中国北方最为重要的植物非生物胁迫因子。虽然已经有研究表明低温胁迫提高了人参皂苷的量^[6]，但是研究低温胁迫对人参皂苷生物合成途径基因家族表达特性的影响还未见报道。植物对低温胁迫的主要分子响应机制是改变基因的表达，通过调控不同代谢途径和信号转导途径，从转录和翻译水平上做出响应^[10]。本实验以人参愈伤组织为材料，分别对低温胁迫下 3 个基因家族 (PgHMGR、PgSS、PgSE) 的表达特性进行研究。

相对于动物、古生菌和真菌、细菌中单一的 HMGR 来说，植物中的 HMGR 由多种 HMGR 编码，并显现出复杂的发育和环境调控^[12-13]。本研究中发现，随着低温胁迫处理时间的增加，PgHMGR 的各个成员出现不同的低温响应。图 1 中 PgHMGR1 的表达量在低温胁迫下响应缓慢，在 D3 时期较 CK 显著增加，随后下降，推测 PgHMGR1 在一定程度上对响应低温胁迫起到关键作用。Burnett 等^[13]研究

表明喜树 hmg1 融合 β -葡萄糖苷酶基因 (GUS) 在受到机械损伤的烟草中，其表达量显著增加，持续时间超过 72 h，分析可能是由于 HMGR 对不同的非生物胁迫响应时间不同，然而这个 GUS 活性的增加完全被茉莉酸甲酯处理抑制，推测 HMGR 在生物胁迫和非生物胁迫中起到不同的作用。相反地，同为家族成员的 PgHMGR2 在低温胁迫下反应迅速，在 D1 时期即达到 CK 组的 3.8 倍，分析 PgHMGR2 可能是人参愈伤组织中响应低温胁迫时的关键家族成员。Kim 等^[12]推测 PgHMGR2 在受到胁迫时起到特殊作用，这为本实验的结果提供了有力的依据。随着处理时间延长，PgHMGR2 的表达量在 D2 时期减少，这可能是由于前期积累的底物不足所导致。PgHMGR3 的表达量变化趋势和 PgHMGR1 基本一致，不同的是在整个低温处理过程中并无显著变化，分析 PgHMGR3 可能起到看家基因的作用。Kim 等^[12]推测 PgHMGR3 充当着看家基因的作用，Suzuki 等^[14]也已证实拟南芥中的 HMG1 编码一个 HMGR 看家基因的形式，并且在三萜生物合成代谢方面起到重要作用。然而杨瑞仪等^[15]研究表明黄花蒿中的 HMGR 在 4 °C 诱导 24 h 后表达量提高了 3.2 倍，Kawoosa 等^[16]研究发现胡黄连中的 PgHMGR 在低温 (15 °C) 时表达量比对照组 (25 °C) 提高了 2.16 倍，分析可能是由于 HMGR 在不同植物不同次生代谢途径中扮演着不同的角色。此外，PgHMGR1、2、3 在 D3 时期的表达量几乎一致且在正常水平以上，分析可能是此时的人参愈伤组织已经适应了低温环境，而后在 D4 时期均下降，这可能是由于处于细胞水平上的愈伤组织难以承受较长时间的低温胁迫所导致，也可能是此时愈伤组织自身产生了某些物质抑制了 PgHMGR 的表达。

PgSS 通常被认为是人参皂苷生物合成途径的关键限速酶，其可作为一个潜在的调控节点，控制着碳流的流向^[17]。从图 2 的结果中可以看出，PgSS1 在低温处理下响应缓慢，初期减少随后增加，并在 D3 时期达到峰值，是对照组的 1.7 倍，随后下降。Mi 等^[18]利用茉莉酸甲酯处理人参不定根，显著增加了 PgSS1 转录水平。PgSS1 的峰值出现稍晚，可能是由于前期合成的底物不足导致，这验证了其表达具有时序性，也和目前公认的人参皂苷生物合成途径的趋势是相同的^[19]。然而 PgSS2 在处理过程中无显著增加，但表达量变化趋势与 PgSS1 一致，分

析其可能起到辅助 PgSS1 的功能。Kim 等^[20]研究表明, PgSS2 在茉莉酸甲酯处理的人参不定根中显著增加, 分析可能是由于 PgSS2 在组织水平和细胞水平中的表达模式不同所导致。随着处理时间增加, 两个家族成员的表达量在 D4 时期均减少, 这可能是由于其催化生成的产物积累达到一定值, 反馈抑制了基因的表达, 也可能是此时愈伤组织对于长时间的低温胁迫表现出代谢机能下降。

PgSE 处于人参皂苷生物合成途径的末端, 其催化鲨烯生成人参皂苷和甾醇的共同前体物质 2,3-氧化鲨烯^[3]。图 3 结果表明, 在低温胁迫 D1 时期 PgSE1 和 PgSE2 响应迅速且强烈, 分别是对照组的 6.9 倍和 6 倍, 因此 PgSE1、PgSE2 可能是参与人参皂苷或其他物质生物合成的关键基因。Han 等^[21]推测 PgSE1 在三萜类生物合成中起到调控作用, 而 PgSE2 则在甾醇生物合成中起到作用, 这验证了本实验的推测。随后二者的表达量在 D2 时期均下降到正常水平以下, 分析可能是由于合成的产物足够抵御低温胁迫; 随着处理时间的增加, PgSE1 一直下降, 然而 PgSE2 在 D3 时期几乎恢复到正常水平, 这可能是由于此时愈伤组织需要合成更多的人参皂苷来抵御低温, 故 PgSE2 起到了补足 PgSE1 的作用。然而 PgSE3 在整个处理过程中受低温胁迫的影响较大, 表达量持续处于低水平状态, 并未起到关键作用, 这可能是在一定的阶段其作用受到家族成员的抑制所致。Kim 等^[22]研究发现茉莉酸甲酯诱导的人参毛状根中 PgSE3 的表达量增加了 2 倍, 分析可能是毛状根和愈伤组织本身代谢机能不同导致, 也可能是 PgSE3 在不同胁迫下具有不同的响应模式。与 PgHMGR 和 PgSSs 相比, PgSEs 显现出更强的诱导表达, 这表明在低温胁迫处理下, PgSEs 的作用可能比 PgHMGR 和 PgSSs 更为关键。

综上所述, 本研究初次分析了低温胁迫对人参皂苷生物合成基因家族表达特性的影响, 发现了 PgHMGR1、PgHMGR2、PgSS1 以及 PgSE1、PgSE2 是响应低温胁迫的关键家族成员, 为今后研究低温胁迫下各成员之间是否存在协同作用或功能冗余提供了重要的理论依据, 同时也为以后研究利用基因表达调控人参皂苷量奠定基础。

参考文献

[1] Kim Y J, Zhang D, Yang D C. Biosynthesis and biotechnological production of ginsenosides [J]. *Biotechnol Adv*, 2015, 33(6): 717-735.

- [2] Wang J, Gao W Y, Zhang J, *et al.* Advances in study of ginsenoside biosynthesis pathway in *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. *Acta Physiol Plant*, 2011, 34(2): 397-403.
- [3] 明乾良, 韩 婷, 黄 芳, 等. 人参皂苷生物合成途径及其相关酶的研究进展 [J]. *中草药*, 2010, 41(11): 1913-1917.
- [4] 罗红梅, 宋经元, 李雪莹, 等. 人参皂苷合成生物学关键元件 HMGR 基因克隆与表达分析 [J]. *药学报*, 2013, 35(2): 219-227.
- [5] 杨 鹤, 郜玉钢, 李瑶瑛, 等. 人参皂苷等萜类化合物生物合成途径及 HMGR 的研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2008, 28: 130-135.
- [6] Oh J Y, Kim Y J, Jang M G, *et al.* Investigation of ginsenosides in different tissues after elicitor treatment in *Panax ginseng* [J]. *J Ginseng Res*, 2014, 38(4): 270-277.
- [7] Baeg I H, So S H. The world ginseng market and the ginseng (Korea) [J]. *J Ginseng Res*, 2013, 37(1): 1-7.
- [8] Chhotaram S, Rupali K, Pandurang D, *et al.* Ginseng-multipurpose herb [J]. *J Biomed Sci Res*, 2010, 2(1): 6-17.
- [9] You J, Liu X, Zhang B, *et al.* Seasonal changes in soil acidity and related properties in ginseng artificial bed soils under a plastic shade [J]. *J Ginseng Res*, 2015, 39(1): 81-88.
- [10] Ruelland E, Vaultier M N, Zachowski A, *et al.* Chapter 2 cold signalling and cold acclimation in plants [J]. *Adv Bot Res*, 2009, 49: 35-150.
- [11] Xu X, Hu X, Neill S J, *et al.* Fungal elicitor induces singlet oxygen generation, ethylene release and saponin synthesis in cultured cells of *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46(6): 947-954.
- [12] 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.
- [13] Burnett R J, Maldonado-Mendoza I E, Mcknight T D, *et al.* Expression of a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene from *Camptotheca acuminata* is differentially regulated by wounding and methyl jasmonate [J]. *Plant Physiol*, 1993, 103(1): 41-48.
- [14] Suzuki M, Kamide Y, Nagata N, *et al.* Loss of function of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 1 (HMG1) in *Arabidopsis* leads to dwarfing, early senescence and male sterility, and reduced sterol levels [J]. *Plant J*, 2004, 37(5): 750-761.
- [15] 杨瑞仪, 卢元媛, 杨雪芹, 等. 低温诱导黄花蒿中青蒿素的生物合成及其机制研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(2):

- 350-354.
- [16] Kawoosa T, Singh H, Kumar A, *et al.* Light and temperature regulated terpene biosynthesis: hepatoprotective monoterpene picroside accumulation in *Picrorhiza kurrooa* [J]. *Funct Integr Genom*, 2010, 10(3): 393-404.
- [17] 于丽莉. 诱导子调控下人参发状根皂苷合成相关基因表达的研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2014.
- [18] Mi H L, Jae H J, Jin W S, *et al.* Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* overexpressing squalene synthase gene [J]. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45(8): 976-984.
- [19] Liang Y, Zhao S. Progress in understanding of ginsenoside biosynthesis [J]. *Plant Biol*, 2008, 10(4): 415-421.
- [20] Kim T D, Han J Y, Huh G H, *et al.* Expression and functional characterization of three squalene synthase genes associated with saponin biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52(1): 125-137.
- [21] 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.
- [22] Kim O T, Bang K H, Kim Y C, *et al.* Upregulation of ginsenoside and gene expression related to triterpene biosynthesis in ginseng hairy root cultures elicited by methyl jasmonate [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2009, 98(1): 25-33.