

温度调控对人参皂苷积累及其关键酶基因表达的影响

张 涛, 王 冠, 张维维, 陈 湘, 张庆贺, 刘芳馨, 李卓然, 齐伟辰*

长春中医药大学药学院, 吉林 长春 130117

摘 要: **目的** 探究温度调控对人参皂苷积累及其合成途径关键酶基因表达量的影响。**方法** 以培养 23 d 人参愈伤组织为实验材料, 置于 5、10、15、20、25、30 °C 6 个培养箱中恒温培养, 每天取样 1 次连续取样 8 d, 测定干、鲜质量和皂苷含量, 确定响应敏感温度, 以 GAPDH 为内参基因, real-time PCR 检测皂苷合成途径中 9 个关键酶 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (HMGR2)、法尼基焦磷酸合成酶 (FPS)、角鲨烯合成酶 (SS1)、角鲨烯环氧化物 (SE1)、达玛烷二醇合成酶 (DS-II)、 β -香树脂素合成酶 (PNY1)、 β -香树脂素 C-28 位羟基化酶 (CYP716A52v2)、原人参三醇合成酶 (CYP716A53v2)、原人参二醇合成酶 (CYP716A47) 基因表达量。**结果** 20 °C 为人参愈伤组织干、鲜质量积累最佳温度, 5、10、15 °C 皂苷含量 2~3 d 达到最大值, 5 °C 为人参皂苷积累响应敏感温度, 与对照组差异显著, 人参皂苷 Re、Rg₁ 和总皂苷分别为对照组 1.93、11.93 和 1.54 倍。HMGR2、SS1、DS-II、SE1 和 CYP716A52v2 基因表达量在低温 2~4 d 均达最大值, 为对照组 2.8、1.6、3.5、3.7 和 3.8 倍。相关性分析发现 SE1 与人参皂苷 Re、Rg₁ 和总皂苷呈显著正相关关系。**结论** 适度的低温有利于人参皂苷的快速积累, SS1、DS-II、SE1、HMGR2、CYP716A52v2 为响应低温的关键基因, 在人参皂苷生物合成抵御低温的过程中发挥重要作用。

关键词: 温度; 人参皂苷 Re; 人参皂苷 Rg₁; 基因表达量; 相关性

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)19-5035-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.19.023

Effects of temperature regulation on ginsenoside accumulation and expression of key enzyme genes

ZHANG Tao, WANG Guan, ZHANG Wei-wei, CHEN Xiang, ZHANG Qing-he, LIU Fang-xin, LI Zhuo-ran, QI Wei-chen

School of Pharmacy, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China

Abstract: **Objective** To explore the effect of temperature regulation on the accumulation of ginsenosides and the expression of key enzyme genes in the synthetic pathway. **Methods** The ginseng callus cultured for 23 d was used as the test material and placed in six incubators at 5, 10, 15, 20, 25, and 30 °C. The dry fresh weight and saponin content were measured to determine the response sensitive temperature. GAPDH was used as the internal reference gene. Real-time PCR was used to detect nine key enzymes in the saponin synthesis pathway, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR2), Farnesyl pyrophosphate synthase (FPS), squalene synthetase (SS1), squalene epoxidase (SE1), dammarane diol synthase (DS-II), β -xanthin synthase (PNY1), β -xanthophyll C-28 hydroxylase (CYP716A52v2), protopanaxatriol synthase (CYP716A53v2), and protopanaxadiol synthase (CYP716A47). **Results** 20 °C was the optimal temperature for the accumulation of dry and fresh weight of ginseng callus. The content of saponin in 5, 10, and 15 °C reached the maximum value for 2—3 d. Re, Rg₁, and total saponins were 1.93, 11.93, and 1.54 times that of the control group, respectively. The expression levels of HMGR2, SS1, DS-II, SE1 and CYP716A52v2 reached their maximum values at 2—4 d of low temperature, which were 2.8, 1.6, 3.5, 3.7, and 3.8 times higher than those of the control group. Correlation analysis found that SE1 was significantly positively correlated with Re, Rg₁ and total saponins. **Conclusion** Moderate low temperature is conducive to the rapid accumulation of ginsenosides. SS1, DS-II, SE1, HMGR2, and CYP716A52v2 are key genes that respond to low temperatures, which play an important role in the process of ginsenoside biosynthesis against low temperatures.

Key words: temperature; ginsenoside Re; ginsenoside Rg₁; gene expression; correlation

收稿日期: 2020-03-06

基金项目: 2020 年吉林省中医药科技项目 (2020042); 长春中医药大学“杏林学者青年科学家”资助项目; 2020 年长春中医药大学大学生创新创业训练计划支持项目; 2020 年吉林省中医药科技项目 (2020052)

作者简介: 张 涛 (1991—), 男, 博士, 讲师, 主要从事中药资源研究。E-mail: 251073371@qq.com

*通信作者 齐伟辰 (1979—) 硕士, 副教授, 从事中药资源学研究。E-mail: 125034717@qq.com

人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 为五加科多年生宿根草本植物, 珍贵中药材, 应用历史悠久, 有“百草之王”的美誉。人参皂苷为其主要药效成分, 按苷元基本骨架分为齐墩果烷型和达玛烷型, 均为三萜类化合物, 目前已从人参中分离得到了约 180 种人参皂苷单体^[1-4], 人参皂苷在调节免疫力、抗压抗疲劳、抗氧化、抗炎、抗肿瘤、降血糖、保肝护肝等方面有很好的功效^[5-7], 具有很高的医学价值和商业价值^[8]。环境因素影响人参产地的分布、生长、产量和品质, 不同的生态因素形成了典型的药材道地性。生态环境严重影响了人参皂苷的生物合成及其合成途径中关键酶基因的表达, 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (HMGR) 法尼基焦磷酸合成酶 (FPS)、角鲨烯合成酶 (SS) 角鲨烯环氧酶 (SE)、达玛烷二醇合成酶 (DS)、 β -香树素合成酶 (AS)、细胞色素 P450 是人参皂苷生物合成途径的关键基因, 在人参皂苷生物合成途径中具有关键作用^[9]。

人参野生资源较少, 而人工栽培的人参皂苷含量差异较大, 无法满足人们的市场需求, 严重影响了人参的药用价值。现已广泛采用细胞和组织培养的方法解决这一问题, 该方法具有时间段、效率高、稳定性强等特点, 已成为获得药用植物药效成分有效方法之一, 并得到广泛的应用。温度是组织培养过程中重要的控制条件之一, 温度因子对植物有着重要的生态作用^[10], 有研究表明, 植物积累次生代谢产物所需的生境与其生长发育的适宜条件可能并不一致, 甚至相反, 道地药材的产生与特定生境密切相关^[11], 该生境通常会表现出某种逆境特征^[12]。目前关于温度调控人参中人参皂苷积累及其合成途径关键酶基因表达的影响研究较少, 本研究通过分析不同培养温度下人参愈伤组织中人参皂苷积累的动态变化规律, 并结合其合成途径关键酶基因表达的变化, 进而阐释人参皂苷生物合成对温度调控响应的分子机制, 为进一步揭示人参皂苷生物合成的生理生态机制奠定理论基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

人参愈伤组织来源于吉林抚松二年生人参根, 经长春中医药大学药学院齐伟辰副教授鉴定为人参 *Panax ginseng* C. A. Mey.。

1.2 仪器与试剂

对照品人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re 购自上海源

叶生物科技有限公司 (质量分数 $\geq 98\%$), 娃哈哈矿泉水, 甲醇、乙腈 (Fisher Scientific 公司), 甲醇 (萃取剂) 及其他试剂均为国产分析纯, RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 染料等购自大连宝生物。

Agilent 高效液相色谱仪 1260 (美国 Agilent 公司), Implen Nanophotometer P330 超微量核酸蛋白检测仪 (德国 Implen 公司), MDF-382E 超低温冰箱 (日本 SANYO 公司), Mx3000P 荧光定量 PCR 仪 (美国 Aligent 公司)。

2 方法

2.1 组织培养

选取继代培养长势良好的愈伤组织进行继代培养, 培养条件如下: 20 °C 暗培养, MS 基础培养基, 添加 4% 琼脂, 0.3 mg/L 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D), 0.5 mg/mL Vc (*L*-抗坏血酸), 每瓶继代接种量 (鲜质量) 约为 2.0 g, 暗培养于 20 °C 的培养箱, 培养至 23 d 开始将其分别置于 5、10、15、20 (对照组)、25、30 °C 6 个培养箱中暗培养, 控制除温度外的其他生长环境条件相一致, 从温度调控的第 1 天开始取样, 连续取样 8 d, 每次每个温度取样 30 瓶, 其中 5 瓶经液氮速冻后, -80 °C 冰箱保存, 用于基因表达量检测, 另外 25 瓶测定愈伤组织生长量及皂苷含量。

2.2 人参皂苷含量检测

人参愈伤组织称取鲜质量后, 55 °C 烘干至恒定质量, 用研钵研磨成粉末, 过 40 目筛备用。每个样品精密称取 0.5 g, 加入 30 mL 甲醇, 90 Hz 超声提取 30 min, 将上层清液滤过, 重复 3 次, 合并滤液, 转移置蒸发皿中 60 °C 水浴蒸发, 定容至 1 mL 棕色量瓶, 过 0.22 μ m 针孔滤器, 用于 HPLC 检测。每个样品 3 次重复。色谱条件: Agilent1260 高效液相色谱系统, 色谱柱: 依利特 Hypersil ODS2 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)。流动相组成为乙腈 (A)-水 (B)。洗脱条件: 0~16 min, 19%~23% A; 16~25 min, 23%~28% A; 25~35 min, 28%~70% A; 35~45 min, 70% A。进样量 10 μ L, 柱温 25 °C, 检测波长 203 nm, 体积流量 1.0 mL/min。本研究检测了人参愈伤组织中 11 个单体皂苷, 仅检测到 2 种单体皂苷 (人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Re), 总皂苷为 2 种单体皂苷的总和。

2.3 荧光定量 PCR (Real-time PCR)

取 -80 °C 保存的人参愈伤组织, 于液氮预冷的

研钵中充分研磨,按照 Takara 植物通用总 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA,Implen Nanophotometer P330 检测 RNA 浓度及纯度。将检测合格的总 RNA 按照 Takara 反转录试剂盒说明书进行反转录,将反转录得到的 cDNA 存放于 -20°C 冰箱备用。内参基因和特异性引物序列见表 1,采用 SYBR 染料法,以 cDNA 为模板,根据表 2 中的引物序列,反应体系如下: ddH₂O 7.0 μL , SYBR

Premix Ex TaqTM 10 μL , 正反引物各 1.0 μL , cDNA 模板 1.0 μL , 共 20 μL 。PCR 反应程序为 95°C 预变性 30 s; 40 个循环(95°C 变性 5 s; 55°C 退火 32 s), 72°C 退火, 延伸 20 s; 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行实时荧光定量 PCR 结果的计算, 计算目的基因的相对表达量, 其中 $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{实验组目的基因的 Ct 值} - \text{实验组内参基因的 Ct 值}) - (\text{对照组目的基因的 Ct 值} - \text{对照组内参基因的 Ct 值})$ 。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物

Table 1 Real-time fluorescence quantitative PCR primers.

基因	登陆号	引物序列 (5'-3')	产物长度/bp
GAPDH	KY400031	正向: ATGGACCATCAGCAAAGGAC 反向: GGTAGCACTTCCCAACAGC	117
HMGR2	JX648390	正向: TCTCAAAGCCTCTGATGC 反向: TTTTGGGGATTGGATTGTCA	126
FPS	DQ087959	正向: CAAGAAGCATTTCCGACAA 反向: CTCTCCTACAAGGGTGGTGA	116
SS1	AB115496	正向: GGACTTGTGGATTAGGGTTG 反向: ACTGCCTTGGCTGAGTTTC	107
SE1	AB122078	正向: ATGCTTTGAATATGCGCCATC 反向: CATGGAGATCGCGTAAAGGTC	102
DS-II	AB265170	正向: CAAATGCCACAAGGATATTGTC 反向: TGCGAACACCACCTTACAC	105
PNY1	AB009030	正向: GCGGAAGGGAATAAGATGAC 反向: CTCAGCTCTCCGGACAGC	108
CYP716A47	JN604536	正向: TCACCTTCGTTCTCAACTATC 反向: TCTTCCTCAAATCCTCCCAAT	129
CYP716A52v2	JX036032	正向: AGGAGCAAATGGAGATAG 反向: AACCGTTGTAGGTGAAAT	106
CYP716A53v2	JX036031	正向: ATCGGACAACGAGGCAGCAC 反向: GCCAACAGGCCAACTCAA	102

2.4 数据处理

利用 Excel 2016 对原始数据进行汇总整理, 采用 DPS 进行单因素方差分析及相关性分析; 并采用 GraphPad prism 6.0 进行图形绘制。

3 结果与分析

3.1 温度对人参愈伤组织生物量的影响

温度调控对人参愈伤组织鲜质量和干质量的影响如图 1-A、1-B 所示, 20°C 为人参愈伤组织的最佳培养温度。不同培养温度下人参愈伤组织干质量和鲜质量的变化趋势基本一致, 各培养温度之间干质量和鲜质量差异显著, 对照组 (20°C) 培养条件下的干质量和鲜质量的峰值均出现在温度调控的第 7 天, 而其他温度调控下愈伤组织干质量和

鲜质量的峰值均有不程度的提前。对照组培养下的愈伤组织鲜质量和干质量的峰值为 11.21、0.41 g。 5°C 、 10°C 、 15°C 、 25°C 、 30°C 的鲜质量峰值分别为对照组 (20°C) 的 71.19%、72.88%、77.44%、84.76%、78.61%, 而干质量峰值分别为对照组 (20°C) 的 71.50%、74.63%、80.52%、88.32%、87.70%。结果表明, 20°C 为人参愈伤组织生长的适宜温度, 温度过高或者过低均不利于人参愈伤组织生长。

3.2 温度调控对人参愈伤组织中皂苷含量的影响

温度调控下人参愈伤组织中皂苷含量差异显著, 变化如图 2 所示, 由于人参愈伤组织生长周期短, 次级代谢产物积累量较少, 本实验只检测到了人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Re。 20°C 处理下人参皂苷

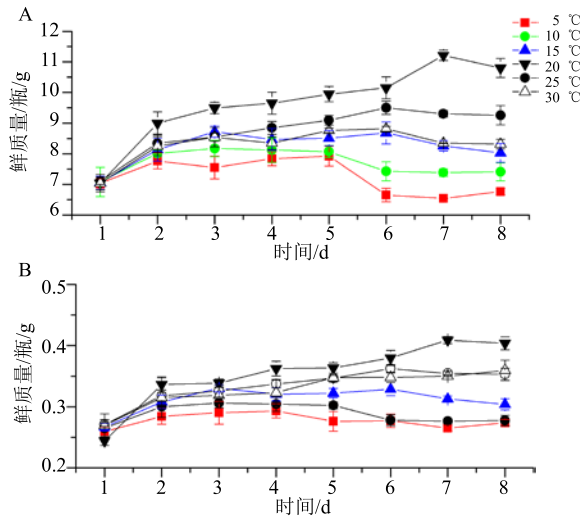
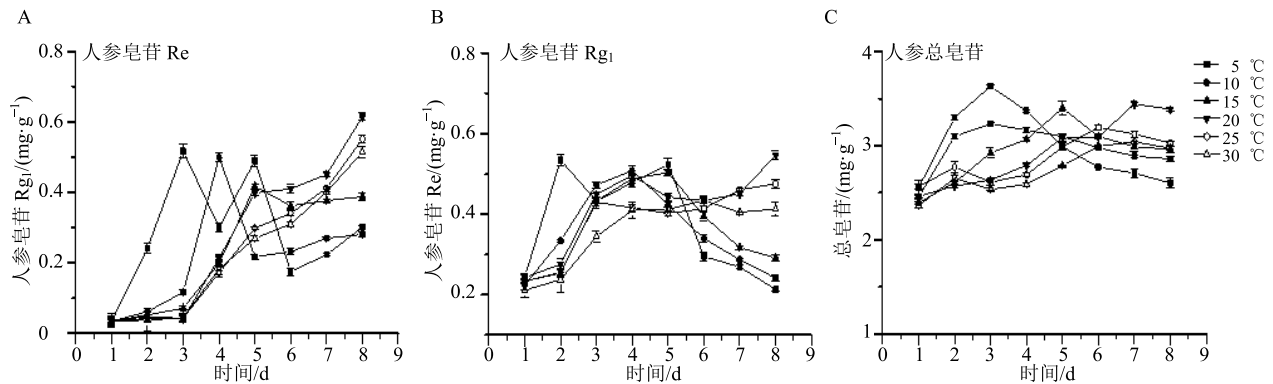


图 1 温度调控对愈伤组织鲜质量 (A) 和干质量 (B) 影响
Fig. 1 Effects of temperature regulation on fresh (A) and dry weight (B) of callus

Rg₁、Re 和总皂苷含量呈现逐渐上升的趋势，其他温度调控下呈现先升高后下降的趋势，对照组人参皂苷 Re 在第 8 天出现最大值 0.547 mg/g，5 °C 处理的最大值 (0.534 mg/g) 出现在 2 d，为对照组 1.93 倍，10 °C 处理的最大值 (0.507 mg/g) 出现在调控 4 d，15 °C 处理最大值 (0.503 mg/g) 出现在 5 d，而 25、30 °C 处理最大值在 8 d，分别为 0.475、0.413 mg/g (图 2-A)。如图 2-B 所示为温度调控下人参皂苷 Rg₁ 的变化趋势，与人参皂苷 Re 相似，对照组人参皂苷 Rg₁ 最大值 (0.614 mg/g) 在 8 d，5 °C 最大值 (0.517 mg/g) 在 3 d，为对照组 11.93 倍，10 °C 最大值 (0.499 mg/g) 在 4 d，15 °C 最大值 (0.418 mg/g) 在 5 d，而 25 °C 和 30 °C 最大值均在 8 d，分别为 0.551 mg/g 和 0.514 mg/g。如图 2-C 所示为温度调控下人参愈伤组织总皂苷变化情况，总皂苷变化与人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rg₁ 基本相同，5 °C 最大值 (3.712 mg/g) 在 3 d，为对



**表示同一时间点处理组与对照组之间差异显著 ($P < 0.01$)，下同

**indicates significant difference between the treatment group and the control group in the same point at 0.01 level, same as below

图 2 温度调控对人参愈伤组织中皂苷含量的影响
Fig. 2 Effect of temperature regulation on saponin content in Callus of *Panax ginseng*

照组 1.54 倍，以上结果均可以显示出适当低温使人参皂苷积累的峰值提前，可促进人参皂苷快速合成积累。

3.3 温度对人参皂苷合成途径关键酶基因表达量的影响

综合分析温度调控下人参皂苷含量和干鲜质量变化，确定 5 °C 为人参愈伤组织响应敏感温度，因此选择 5 °C (处理组) 和 20 °C (对照组) 为试验材料，分析温度调控下人参皂苷合成途径关键酶基因表达量变化。温度调控对人参愈伤组织中关键酶基因表达量的影响如图 3 所示。HMGR2、SS1、SE1、DS-II 和 CYP716A52v2 基因在低温调控下出现先逐渐升高后降低的变化趋势，SS1 和 DS-II 基

因于处理 2 d 达最大值，随后逐渐降低，分别为对照组 1.6、3.5 倍，SE1 和 CYP716A52v2 基因处理 3 d 达最大值，分别为对照组的 3.7、3.8 倍，HMGR2 基因处理 4 d 后达最大值，为对照组 2.8 倍。说明不同基因在低温调控下的表达存在明显的滞后性，响应低温的时间不同，而 FPS、PNY1、CYP716A53v2 和 CYP716A47 基因的表达量在低温调控下与对照组的变化趋势相同，差异不显著。

3.4 温度调控下人参愈伤组织中合成关键酶基因表达量与人参皂苷相关性分析

温度调控下人参愈伤组织中关键酶基因表达量与人参皂苷相关性分析结果如表 2 所示，总皂苷与人参皂苷 Re、SE1 和 CYP716A53v2 呈极显

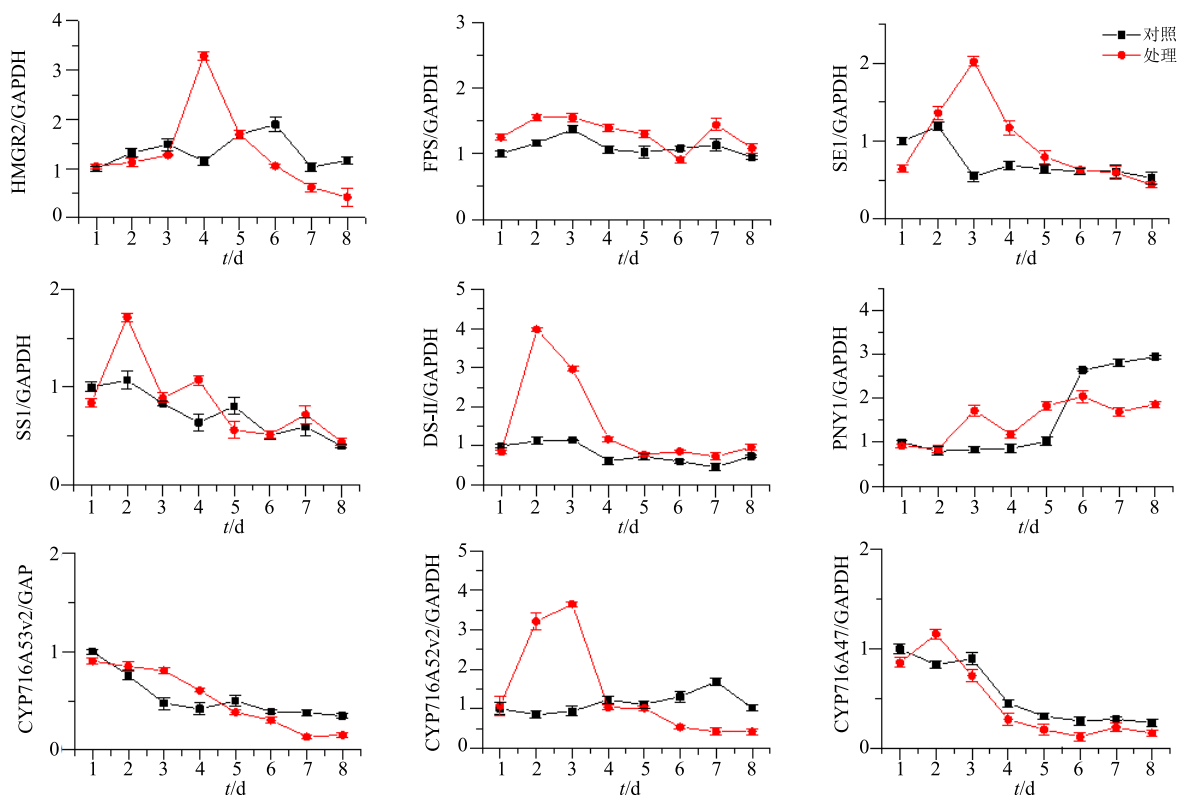


图 3 温度调控对人参愈伤组织次生代谢途径关键酶基因表达量的影响

Fig. 3 Effects of temperature regulation on gene expression of key enzymes in secondary metabolic

表 2 相关性分析

Table 2 Correlation analysis

成分	相关系数								
	HMGR2	FPS	SS1	SE1	DS-II	PNY1	CYP716A52v2	CYP716A53v2	CYP716A47
人参皂苷 R _{g1}	0.24	0.37	0.49	0.66*	0.15	0.44	0.41	-0.08	-0.18
人参皂苷 Re	0.61*	0.59	0.60*	0.64*	0.42	-0.28	0.59	0.43	0.33
总皂苷	0.56	0.67*	0.57	0.94**	0.64*	-0.19	0.50	0.81**	0.37

*0.05 显著相关, **0.01 极显著相关

*correlation is significant at 0.05 level; ** correlation is significant at 0.01 level

著正相关关系 ($P < 0.01$), 与人参皂苷 R_{g1}、FPS 和 DS-II 均呈现正相关关系 ($P < 0.05$), 人参皂苷 Re 与 HMGR2、SS1 和 SE1 呈显著正相关关系 ($P < 0.05$), 人参皂苷 R_{g1} 与 SE1 呈显著正相关关系 ($P < 0.05$)。

4 讨论

次生代谢产物的生物合成受到遗传因素(如种质资源)和环境因素(如温度、水分、光照、土壤等)的共同作用。有研究表明, 药用植物生长发育的最适环境与药用植物药效成分积累的最适环境不同^[13-15]。低温条件下, 植物通过改变外部形态以适应低温环境, 与此同时, 激活次级代谢产物合成

途径关键酶基因表达, 植物快速积累次生代谢产物来抵御低温条件带来的损伤^[16]。本实验通过温度调控, 对人参愈伤组织生长、皂苷含量和关键酶基因表达量进行研究, 为阐释人参皂苷生物合成对温度调控的响应机制研究奠定理论基础。

本研究发现低于或高于对照组(20 °C)的培养温度均不利于人参愈伤组织鲜质量和干质量的积累, 20 °C为人参愈伤组织培养的最适温度。愈伤组织中单体皂苷与总皂苷之间变化趋势相同, 有研究表明, 皂苷之间存在协同增减趋势^[17-18], 与本研究结果一致。低于 20 °C的培养温度均可以使愈伤组织中人参皂苷快速积累峰值具有一定程度的

提前, 5 ℃ 培养的总皂苷含量最大值高于 20 ℃ 最大值, 这结果与 You 等^[19]和 Jiang 等^[20]的结果相一致, 适度的低温有利于人参皂苷的积累, 温度过高不利于人参皂苷的积累。虽然低温 5 ℃ 处理人参愈伤组织生物量积累较低, 但其具有最大的人参皂苷积累量, 并且人参皂苷积累的最大值提前, 缩短了培养时间, 从工业生产角度考虑, 短时低温处理可有效的提高次生代谢产物的积累, 节约成本, 为人参皂苷工业化生产技术的创新提供理论参考。

目前, 人参皂苷的生物合成途径几乎全部明晰, 有研究表明, 合成途径的关键酶基因在抵御低温过程中具有着重要作用^[21]。本研究选择人参皂苷生物合成途径上、中、下游 9 个基因为研究对象, 其中 SS1 和 DS-II 在低温第 2 天基因表达量最大值为对照组基因表达量的 1.6 和 3.5 倍, 与皂苷变化趋势相同, 这与林红梅研究^[22]结果相一致。SE1、HMGR2、CYP716A52v2 在低温处理第 3、4 天基因表达量最大值为对照组的 3.7、3.8、2.86 倍, 说明基因表达量存在一定的滞后性, 与张涛研究结果相一致^[23], SS1、DS-II、SE1、HMGR2、CYP716A52v2 为响应低温的关键基因, 说明其在人参皂苷生物合成响应低温过程中发挥重要作用, 同时进行相关性分析发现, SE1 与皂苷呈显著正相关关系, SE1 可作为重点响应低温的关键基因。以上研究为阐释人参皂苷生物合成对温度调控响应的分子机制, 揭示人参皂苷生物合成的生理生态机制奠定理论基础。

参考文献

- [1] Christensen L P. Ginsenosides: Chemistry, biosynthesis, analysis and potential health effects (Chapter 1) [J]. *Adv Food Nutr Res*, 2008, 55(55): 1-99.
- [2] In A L, Hyam S R, Se E J, et al. Ginsenoside Re ameliorates inflammation by inhibiting the binding of lipopolysaccharide to TLR4 on macrophages [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(38): 9595-9602.
- [3] Shi Y, Sun C, Zheng B, et al. Simultaneous determination of ten ginsenosides in American ginseng functional foods and ginseng raw plant materials by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Food Analyt Method*, 2013, 6(1): 112-122.
- [4] Sun B S, Pan F Y, Sung C K. Repetitious steaming-induced chemical transformations and global quality of black ginseng derived from *Panax ginseng* by HPLC-ESI-MS/MSn based chemical profiling approach [J]. *Biotechnol Bioprocess Engineer*, 2011, 16(5): 956-965.
- [5] Lian W Q, Chong Z W, Chun S Y. Ginsenosides from American ginseng: chemical and pharmacological diversity [J]. *Phytochemistry*, 2011, 72(8): 689-699.
- [6] Liu Z Q. Chemical insights into ginseng as a resource for natural antioxidants [J]. *Chem Rev*, 2012, 112(6): 3329-3355.
- [7] Leung K W, Wong S T. Pharmacology of ginsenosides: a literature review [J]. *Chin Med*, 2010, 5(1): 20.
- [8] 何道同, 王 兵, 陈珺明. 人参皂苷药理作用研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(07): 118-121.
- [9] Yang J, Hu Z, Zhang T, et al. Progress on the studies of the key enzymes of ginsenoside biosynthesis [J]. *Molecular*, 2018, 589(23): 1-12.
- [10] 杨允菲, 祝 延, 王德利, 等. 植物生态学 [M]. 第 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2011.
- [11] 肖小河, 夏文娟, 陈善壖. 中国道地药材研究概论 [J]. 中国中药杂志, 1995, 30(6): 323-326.
- [12] 黄璐琦, 张瑞贤. “道地药材”的生物学探讨 [J]. 中国中药杂志, 1997, 32(9): 563-566.
- [13] 郭兰萍, 黄璐琦, 阎 洪, 等. 基于地理信息系统的苍术道地药材气候生态特征研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 40(8): 565-569.
- [14] 郭兰萍, 黄璐琦, 邵爱娟, 等. 苍术根际区土壤养分变化规律 [J]. 中国中药杂志, 2005, 40(19): 28-31.
- [15] 刘昌孝, 黄璐琦. 分子生药学 [M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2015.
- [16] Kim D S, Song M, Kim S H, et al. The improvement of ginsenoside accumulation in *Panax ginseng* as a result of gamma-irradiation [J]. *J Ginseng Res*, 2013, 37(3): 332-340.
- [17] 王康宇, 张美萍, 李 闯, 等. 人参 15 个组织器官中皂苷量与 6 种人参皂苷生物合成基因表达的相关性研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 50(16): 3168-3173.
- [18] 张 涛. 生态因子与人参 CYP716A52v2 和 CYP716A53v2 基因表达量和皂苷含量相关性研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2016.
- [19] 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.
- [20] Jiang M, Liu J, Quan X, et al. Different chilling stresses stimulated the accumulation of different types of different types of ginsenosides in *Panax ginseng* cells [J]. *Acta Physiol Plant*, 2016, 210(38): 1-8.
- [21] 刘 佳, 全雪丽, 姜明亮, 等. 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 [J]. 中草药, 2016, 47(11): 1956-1961.
- [22] 林红梅. 生态因子对人参皂苷含量及其生物合成关键酶基因表达的影响 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2016.
- [23] 张 涛. 人参及其皂苷生物合成对低温的生理生态响应机制研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2019.