

肥料配施对北苍术 3 种倍半萜类成分及 2 种生物合成关键酶基因表达的影响

王孟聪, 翁丽丽, 孙 金, 肖春萍*, 陈天丽*

长春中医药大学药学院, 吉林 长春 130117

摘 要: **目的** 探讨不同肥料配施对北苍术 *Atractylodes chinensis* (DC.) Koidz. 3 种倍半萜成分苍术酮、白术内酯 II 和 β -桉叶醇含量及 2 种生物合成关键酶 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶(3-hydroxy-3-methylglutarate monoacylase A reductase, HMGR) 和法呢基焦磷酸合酶基因(farnesyl pyrophosphate synthase, FPPS) 活性及基因表达的影响。**方法** 在不同的肥料配施下, 采用高效液相色谱法测定北苍术 3 种倍半萜类成分的含量, 采用试剂盒法(双抗体夹心法)测定北苍术根茎中 HMGR 和 FPPS 的活性; 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法测定北苍术 HMGR 和 FPPS 的表达量; 采用 SPSS 软件对生物合成关键酶活性和基因表达量进行相关性分析。**结果** 适宜的氮磷钾配施, 可促进北苍术倍半萜类成分的积累, 并显著提高其生物合成关键酶活性及基因表达。该试验区所代表的土壤肥力状况下有利于倍半萜类成分积累的最优施肥方案为氮肥(N) 180 kg/hm², 磷肥(P₂O₅) 225 kg/hm², 钾肥(K₂O) 105 kg/hm²。不同肥料配施下, 关键酶基因 HMGR 与苍术酮、 β -桉叶醇呈显著正相关($P < 0.05$); 关键酶基因 FPPS 与白术内酯 II、 β -桉叶醇呈极显著正相关($P < 0.01$), 与苍术酮显著相关($P < 0.05$)。**结论** 优化氮磷钾配施对北苍术倍半萜类成分苍术酮、白术内酯 II 和 β -桉叶醇积累及生物合成关键酶 HMGR 和 FPPS 活性及基因表达作用显著, 北苍术根茎中倍半萜类成分苍术酮、白术内酯 II 和 β -桉叶醇的生物合成受到多种基因及酶的调控, 其中关键酶 FPPS 发挥了较大的调控作用。

关键词: 北苍术; 肥料配施; 倍半萜; 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶; 法呢基焦磷酸合酶; 基因表达; 白术内酯 II; β -桉叶醇; 苍术酮

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)13-4109-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.13.024

Effects of combined application of fertilizer on gene expression of three sesquiterpenes and two key biosynthesis enzymes in *Atractylodes chinensis*

WANG Meng-cong, WENG Li-li, SUN Jin, XIAO Chun-ping, CHEN Tian-li

College of Pharmacy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of different fertilizer combinations on the contents of sesquiterpene components in *Atractylodes chinensis*, including atractylone, atractylenolide-II and β -eudesmol, and the activities and gene expression of the key enzymes for biosynthesis of 3-hydroxy-3-methylglutarate monoacylase A reductase (HMGR) and farnesyl pyrophosphate synthase (FPPS). **Methods** Under different fertilizer combinations, the contents of three sesquiterpenes in *A. chinensis* were determined by HPLC, and the activities of HMGR and FPPS in rhizomes of *A. chinensis* were determined by kit method (double antibody sandwich method). qRT-PCR was used to determine the expression levels of HMGR and FPPS in *A. chinensis*. SPSS software was used to analyze the correlation between the activities of key enzymes in biosynthesis and gene expression quantity. **Results** The suitable combination of nitrogen, phosphorus and potassium could promote the accumulation of sesquiterpenes in *A. chinensis*, and significantly improved the activity and gene expression of key enzymes in biosynthesis. The optimal fertilization scheme for sesquiterpene accumulation under the soil fertility condition represented by the test area was N 180 kg/hm², P₂O₅ 225 kg/hm² and K₂O 105 kg/hm². Under different fertilizer combinations, the key enzyme gene HMGR was significantly positively correlated with atractylone and β -eudesmol ($P < 0.05$). The key enzyme gene FPPS was significantly positively correlated with atractylenolide II and β -eudesmol ($P < 0.01$), and significantly

收稿日期: 2021-11-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81803649); 吉林省科技厅科技项目(20191102035YY); 吉林省中医药管理局科技项目(2020047)

作者简介: 王孟聪, 硕士研究生, 研究方向为中药品质鉴定、质量标准以及开发利用。Tel: (0431)81672193 E-mail: 15630714647@163.com

*通信作者: 肖春萍, 讲师, 博士, 研究方向为中药资源、栽培理论和资源开发。Tel: (0431)81672193 E-mail: btxnw@163.com

陈天丽, 实验师, 博士, 研究方向为中药药剂学与药效物质基础研究。Tel: 18604437775 E-mail: 731116920@qq.com

correlated with atractylone ($P < 0.05$). **Conclusion** The optimization of nitrogen, phosphorus and potassium fertilizer application has an effect on the accumulation of atractylone, atractylenolide II and β -eudesmol in *A. chinensis*, and also has significant effects on the activities and gene expression of key biosynthesis enzymes of HMGR and FPPS. The biosynthesis of sesquiterpenes atractylone, atractylenolide II and β -eudesmol in rhizomes of *Atractylodes chinensis* is regulated by a variety of genes and enzymes, and the key enzyme FPPS plays a greater regulatory role.

Key words: *Atractylodes chinensis* (DC.) Koidz.; combined application of fertilizer; sesquiterpene; 3-hydroxy-3-ethylglutarate monoacylase A reductase; farnesyl pyrophosphate synthase; gene expression; atractylenolone II; β -eudesmol; atractylenone

北苍术 *Atractylodes chinensis* (DC.) Koidz. 为菊科多年生草本植物, 以干燥根茎入药^[1]。倍半萜类成分是苍术属植物主要化学成分, 主要包括苍术酮、白术内酯 II、苍术苷 A、 β -桉叶醇等, 具有抗炎、抗肿瘤、保护神经系统、保肝、抗菌、抗病毒等广泛的药理作用, 此类成分的提高对于北苍术药材质量的控制意义重大^[2-4]。研究表明^[5-8], 倍半萜类成分多数通过甲羟戊酸途径在植物体内合成, 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 (3-hydroxy-3-methylglutarate monoacylase A reductase, HMGR) 和法呢基焦磷酸合酶基因 (farnesyl pyrophosphate synthase, FPPS) 是倍半萜类化合物生物合成途径的关键酶和限速酶。HMGR 对 MVA 途径起催化作用, FPPS 催化倍半萜类化合物的前体化合物法呢基二磷酸 (farnesyl diphosphate, FPP) 的合成^[9-10]。药材质量与土壤中营养成分组成等密切相关, 氮、磷、钾是植物生长发育过程中的重要营养元素, 合理施肥可以引起植物有效成分性质或含量的变化, 孙金等^[11]研究发现科学合理的氮、磷、钾施肥可以促进北苍术生长和北苍术中倍半萜类成分含量的增加, 但目前针对肥料施肥对北苍术中倍半萜类成分生物合成影响的研究较少, 作用机制尚不明确。因此, 本研究以北苍术为材料, 研究不同肥料配施下北苍术根茎中苍术酮、白术内酯 II、 β -桉叶醇 3 种倍半萜类成分含量以及关键酶 HMGR 和 FPPS 活性和基因表达量, 分析北苍术倍半萜类与关键酶活性及基因表达之间的关系, 为阐明肥料配施对北苍术倍半萜类成分合成的分子调控机制, 提高北苍术倍半萜类成分含量和品质奠定理论基础, 并为北苍术种植过程中合理的肥料配施提供理论依据。

1 材料

1.1 试验区概况及供试材料

选择前茬作物为玉米的地块作为试验田, 具体位置位于吉林省柳河县安口镇北苍术种植基地, 地

理位置 125°36'4.94"E, 42°12'37.65"N, 海拔 399 m。对土壤情况进行测定: 土壤 pH 为 5.65、有机质含量为 51.73 g/kg、速效氮、有效磷、速效钾含量分别为 41.89、94.40、143.54 mg/kg。选取长势相近, 叶茎完好, 无病虫害, 植株健壮, 根系发达的一年生北苍术苗作为供试材料移栽试验田, 由吉林省昌农实业集团有限公司柳河北苍术栽培基地提供。经长春中医药大学中药资源与鉴定教研室翁丽丽教授鉴定为北苍术 *A. chinensis* (DC.) Koidz. 正品。试验中尿素 (N, 总氮 $\geq 46\%$)、过磷酸钙 (P_2O_5 , 总磷 $\geq 46\%$)、硫酸钾 (K_2O , 总钾 $\geq 50\%$) 为试验用肥料。

1.2 试剂

对照品苍术酮 (批号 P11M10F73437, 质量分数 $\geq 97.3\%$)、 β -桉叶醇 (批号 P24O8F46474, 质量分数 $\geq 99.4\%$)、白术内酯 II (批号 M22A10S95762, 质量分数 $\geq 99.9\%$) 均购于上海源叶生物科技有限公司。磷酸、乙腈为色谱纯; 甲醇分析纯; 水为超纯水。植物通用总 RNA 提取试剂盒, 反转录试剂盒及实时荧光定量 PCR 试剂盒 (宝生物工程大连有限公司)。植物 HMGR ELISA 检测试剂盒、植物 FPPS ELISA 检测试剂盒 (上海江莱生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 试验设计

参考依据北苍术种植基地对北苍术的多年种植实践经验, 对本实验的施肥种类和施肥时间进行设置。采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计优化设置施肥方案^[11], 设置氮、磷、钾 3 个因素, 4 个水平, 正交试验方案见表 1。设置 10 个不同的施肥处理, 3 次重复, 30 个小区, 小区总面积 150 m², 每个小区 3 m² (1.5 m $\times$ 2.0 m), 行株距为 15 cm $\times$ 20 cm, 每个小区栽种 100 株北苍术。北苍术植株于 2019 年 5 月 25 日移栽, 移栽前无任何施肥, 后期除肥料按设计施用外, 其他田间管理措施一致。

表 1 L₉(3⁴) 正交试验设计的施肥种类和施肥量
Table 1 Fertilization types and fertilization amount of orthogonal experiment L₉(3⁴)

处理	组合	施用量/(kg·hm ⁻²)		
		尿素 (N)	过磷酸钙 (P ₂ O ₅)	硫酸钾 (K ₂ O)
T0	N0P0K0	0	0	0
T1	N1P1K1	90	75	105
T2	N1P2K2	90	150	210
T3	N1P3K3	90	225	315
T4	N2P1K2	180	75	210
T5	N2P2K3	180	150	315
T6	N2P3K1	180	225	105
T7	N3P1K3	270	75	315
T8	N3P2K1	270	150	105
T9	N3P3K2	270	225	210

5 月下旬 (苗期) 施入基肥, N 肥 60.0%、P 肥 100.0%、K 肥 33.3%, N、P、K 比例为 6:8:4; 6 月下旬 (营养生长期) 和 8 月下旬 (果期) 分别进行 1、2 次追肥处理, 其中 N 肥 20.0%、K 肥 33.3%, N、K 比均为 2:4。将不同处理组合的氮磷钾肥用相同体积自来水溶解, 均匀喷施于小区土壤表面。

2.2 样品的收集

移栽北苍术种苗前, 随机选取其中的 200 株测定其生长指标, 计算其各指标平均值则为基础生物

量。取样时间是种苗移栽后的第 30、60、90、120、150 d, 在每个平行小区随机取样 6 株, 将取样后的北苍术装入冰盒带回实验室, 将样品除去地上部分和须根后进行清洗, 吸水纸吸干附着水分, 其中一部分根茎样品进行分装、液氮固定, 储存于-80 ℃冰箱备用, 另一部分洗净后室内阴干, 干燥后粉碎过筛备用。

2.3 含量测定

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取白术内酯 II、β-桉叶醇、苍术酮适量, 加甲醇溶解, 配制成质量浓度为 10.1、33.0、53.4 μg/mL 的混合储备液, 备用。

2.3.2 供试品溶液的制备 将处理后的北苍术药材粉碎过三号筛, 精密称定 0.3 g, 参照《中国药典》2020 年版一部苍术项下含量测定方法, 制备供试品溶液。

2.3.3 苍术酮、白术内酯 II、β-桉叶醇含量测定 色谱条件参照本课题组前期建立的北苍术一测多评方法^[6]。

2.3.4 线性回归方程的绘制 精密量取“2.3.1”项下混合储备液逐级稀释成系列浓度 (分别为原浓度的 1.0、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025 倍), 取 15 μL 注入高效液相色谱仪。以峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X), 进行线性回归, 回归方程见表 2。

表 2 3 种对照品回归方程和线性范围

Table 2 Regression equations and linear ranges of three reference substances

成分	回归方程	r	线性范围/μg
苍术酮	$Y = 18\,717.410\,7 X + 1\,756.575\,8$	0.999 7	0.020 0~0.801 0
白术内酯 II	$Y = 47\,177.499\,2 X + 483.693\,0$	0.999 9	0.003 8~0.151 5
β-桉叶醇	$Y = 30\,772.658\,2 X + 4\,034.467\,6$	0.999 5	0.012 4~0.495 0

2.4 关键酶活性测定

称取北苍术根茎 0.2 g, 加入 1.8 mL 预冷的 0.01 mol/L PBS (pH 7.4, NaCl 8 g、Na₂HPO₄ 1.44 g、KH₂PO₄ 0.24 g), 液氮研磨成匀浆, 4 ℃下 10 000 r/min 离心 20 min。采用试剂盒法 (双抗体夹心法) 测定不同肥料配施下北苍术根茎中关键酶 HMGR 和 FPPS 的活性, 操作步骤按照试剂盒内说明书进行, 2 种关键酶 HMGR 标准曲线及测定范围分别为 $Y = 0.030\,5 X + 0.075\,4$, $r = 0.999\,1$, 线性范围为 0~80 U/L; FPPS 标准曲线 $Y = 0.004\,8 X + 0.038\,2$, $r = 0.999\,5$, 线性范围为 0~400 U/mL。

2.5 关键酶基因表达量测定

2.5.1 植物总 RNA 的提取与 cRNA 的合成 根据

Takara 植物通用总 RNA 提取试剂盒说明书提取北苍术根茎总 RNA, 采用 Multiskan Sky 全波长酶标仪测定样品 RNA 浓度及纯度, 并将其反转录成 cDNA, -20 ℃储存, 备用。

2.5.2 引物设计与合成 以 EF-1α 为内参基因^[12], 根据试验样品中转录组筛选出的 HMGR 和 FPPS 基因片段, 由上海生工设计合成引物, 引物序列见表 3。

2.6 引物特异性检测

2.6.1 北苍术内参基因及关键酶基因实时荧光定量 PCR 熔解曲线 以北苍术根茎中 cDNA 为模板, 阴性 (NTC) 为对照进行实时荧光定量 PCR, 所得熔解曲线见图 1, 结果表明 EF-1α、HMGR 和 FPPS 均为特异性单峰, 空白对照无扩增, 且没有引物二

表 3 实时荧光定量 PCR 引物

Table 3 Real-time fluorescent quantitative PCR primers

基因	TRINITY	引物序列 (5'-3')	产物长度/bp
<i>EF-1α</i>		正向 ACCAACTGGGTGACAAGT 反向 AGCCTCGGTAAGGGCTTCAT	64
<i>HMGR</i>	DN14568	正向 AACCGCCACCACTCACTCACATTCTTC 反向 GGACGCCGTGCTTCTGGAC	109
<i>FPPS</i>		正向 TCTTGCGTGTGCCCTTGGTTG 反向 TGACCTCTGCGTGTATGGGACTC	206

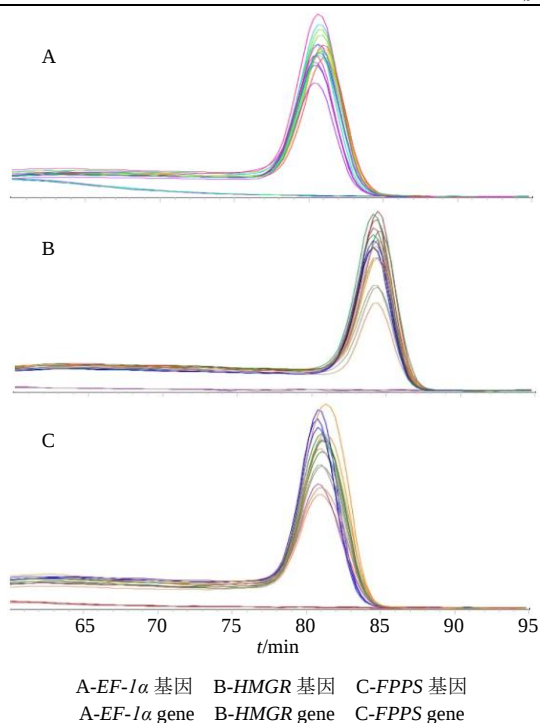


图 1 熔解曲线分析结果

Fig. 1 Results of melting curve analysis

聚体及非特异性扩增干扰,说明本实验引物具有较高的特异性,符合试验要求。

2.6.2 北苍术内参基因及关键酶基因实时荧光定量 PCR 扩增曲线与扩增效率 进行实时荧光定量 PCR 扩增,结果发现以 5 倍梯度稀释北苍术根茎组织 cDNA 后,得到的扩增曲线平滑,指数扩增期明显,得到的北苍术内参基因 *EF-1α* 和关键酶相关基因 *HMGR* 和 *FPPS* 的相对定量标准曲线见图 2,其相关系数及扩增效率符合试验要求,表明该方法的准确性和重复性较好。

2.6.3 实时荧光定量 PCR 扩增 以 cDNA 为模板,根据表 2 中各基因的引物序列,按照 20 μL 反应体系 (SYBR® Premix Ex Taq™ 10.4 μL, 10 μmol/L Forward Primer 0.8 μL, 10 μmol/L Reverse Primer 0.8 μL, cDNA 模板 2 μL, ddH₂O 6 μL) 及反应程序 [95 °C 预变性 30 s; 40 个循环 (95 °C 变性 5 s, 64 °C 退火 1 min)] 对不同肥料配施下北苍术 *HMGR* 和 *FPPS* 基因表达量进行测定,每个样品 3 个生物学重复。RT-PCR 反应

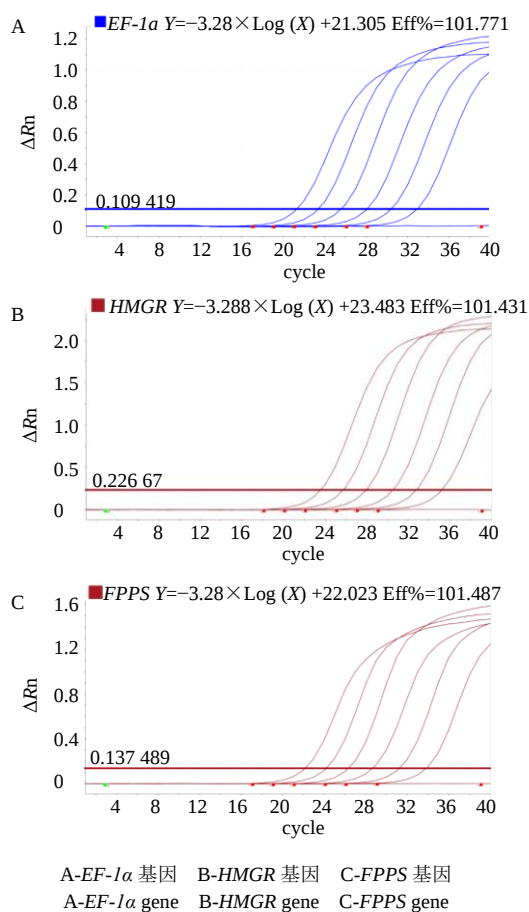


图 2 扩增曲线和扩增效率分析结果

Fig. 2 Results of amplification curve and efficiency analysis

内参基因为 *EF-1α*。

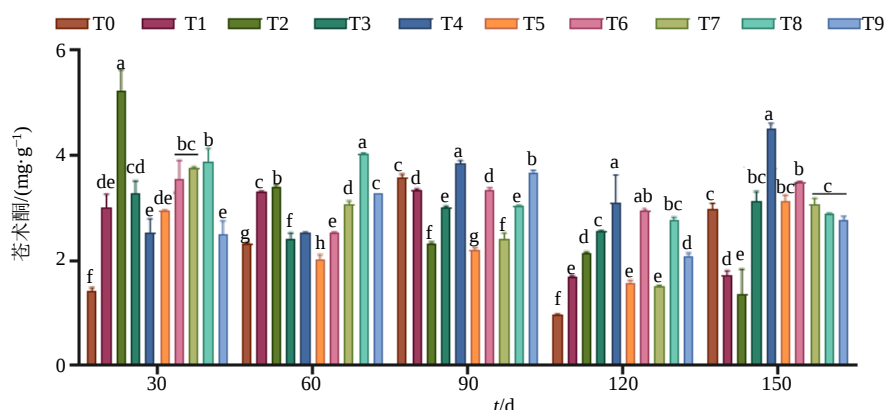
2.7 数据处理

使用 Excel 2019 进行试验数据的换算和预处理,计算实时荧光定量 PCR 结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[13] 进行;数据分析、各参数之间的多重比较及图形绘制等利用 SPSS 21.0、GraphPad prism 6.0、Photoshop CC 2018 进行。

3 结果与分析

3.1 肥料配施对北苍术 3 种倍半萜成分含量的影响

3.1.1 肥料配施对北苍术苍术酮含量的影响 北苍术种苗基础苍术酮质量分数为 $(1.807\ 4 \pm 0.042\ 1)$ mg/g。由图 3 可知,不同肥料配施下,不同方案的



不同字母表示差异性显著, $P < 0.05$, 下同

Different letters indicate significant difference, $P < 0.05$, same as below

图 3 不同氮磷钾配施对北苍术中苍术酮含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of combined application of nitrogen, phosphorus and potassium on atractylone content in *A. chinensis* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

北苍术根茎中苍术酮含量在移栽的 30~120 d 时期整体呈现下降的趋势, 质量分数 0.968 8~5.249 3 mg/g。移栽 150 d 时, 各方案下的苍术酮含量呈现上升的趋势, 质量分数在 1.355 4~4.525 2 mg/g。T4 施肥方案各个时期的苍术酮含量与同时期其他组相比, 处于较高水平, 特别在移栽 150 d 时, 苍术酮含量明显较高, 质量分数达到 4.525 2 mg/g, 是空白组 (T0) 的 1.51 倍。综合分析, 采用 T4 施肥方案, 北苍术根茎中苍术酮含量会达到较高水平, 说明该施肥方案能够有效促进倍半萜类成分代谢, 增加苍术酮的合成与积累。

3.1.2 肥料配施对北苍术 β -桉叶醇含量的影响 北苍术种苗基础 β -桉叶醇质量分数为 ($2.948 8 \pm 0.095 8$) mg/g。由图 4 可知, 不同肥料配施下, 不同方案北苍术根茎中 β -桉叶醇在 30~150 d 呈现下降趋势,

移栽 30 d 的 β -桉叶醇范围在 2.491 5~5.180 5 mg/g。比较各方案 30~120 d 各个时期北苍术根茎中 β -桉叶醇量, T6 方案相对较高, 在 60、90、120 d 的 β -桉叶醇质量分数分别达到 1.013 2、0.817 8、1.388 1 mg/g, 是空白组 T0 的 1.35、3.91、8.74 倍。移栽 150 d 较前一时期整体呈上升趋势, T6 方案仍然处于较高水平, β -桉叶醇质量分数为 0.963 3 mg/g, 是空白组的 1.76 倍。由此可知, T6 方案北苍术根茎中的 β -桉叶醇含量在发育期较高, 表明不同肥料配施的比例可能发挥相似的协同作用, 实际生产过程中可以通过调控肥料的用量和配比降低农业生产成本。

3.1.3 肥料配施对北苍术白术内酯 II 含量的影响 北苍术种苗基础白术内酯 II 质量分数为 ($0.275 7 \pm 0.001 7$) mg/g。由图 5 可知, 不同肥料配施下, 北

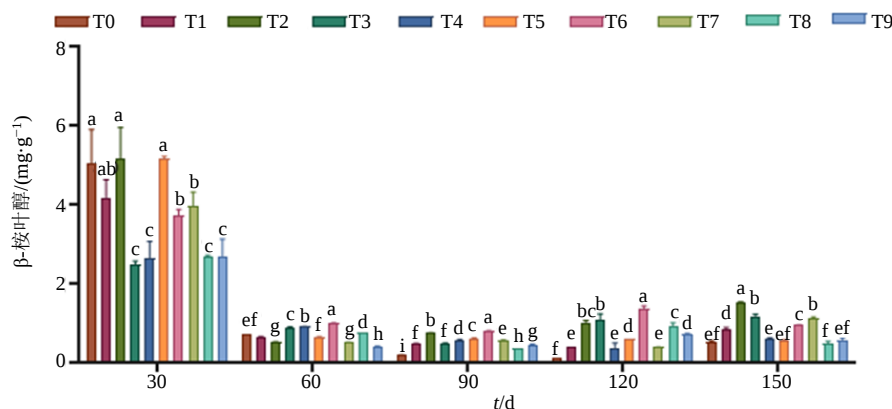
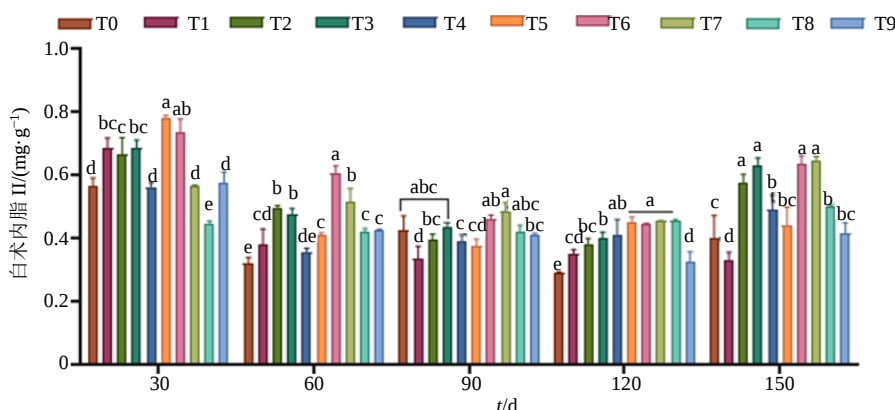


图 4 不同氮磷钾配施对北苍术中 β -桉叶醇含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of combined application of nitrogen, phosphorus and potassium on β -eudesmol content in *A. chinensis* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

图 5 不同氮磷钾配施对北苍术白术内酯 II 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 5 Effects of combined application of nitrogen, phosphorus and potassium on content of atractylenolide II in *A. chinensis* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

苍术根茎中白术内酯 II 的含量变化趋势与 β -桉叶醇相似, 不同方案下的北苍术根茎中白术内酯 II 含量在移栽 30~150 d 时期整体呈现下降的趋势。移栽 30 d 时的北苍术根茎中白术内酯 II 质量分数在 0.449 2~0.783 7 mg/g, 其中 T6 施肥方案下的白术内酯 II 质量分数为 0.738 6 mg/g, 与其他组相比相对较高。综合移栽 30~150 d 各个时期, T6 方案相对其他方案白术内酯 II 含量处于较高水平, 在 30、60、90、120、150 d 的白术内酯 II 质量分数分别为 0.738 6、0.607 5、0.461 0、0.445 3、0.638 5 mg/g, 是空白组的 1.30、1.89、1.08、1.53、1.58 倍。综合上述分析, T6 方案施肥下北苍术根茎中的白术内酯 II 含量在发育期较高, 证明该施肥方案可以促进倍半萜类成分的合成与积累。

3.1.4 不同肥料配施下北苍术最佳施肥方案分析 综合性评价采收期 (即 150 d 时) 不同肥料配施下的北苍术生长状况, 分析方法采用模糊数学隶属函数法, 隶属函数公式如下。当某一指标与生长状况呈负相关时, 采用公式 (2) 进行计算^[11]。

$$U(X_i) = (X_i - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min}) \quad (1)$$

$$U(X_i) = 1 - (X_i - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min}) \quad (2)$$

$U(X_i)$ 为不同肥料配施下北苍术某个测定指标, $X_{\min}$ 为该指标的最小值, $X_{\max}$ 为该指标的最大值。

通过计算不同肥料配施下北苍术各指标的平均隶属函数值, 分析施肥条件对北苍术生长的影响。平均隶属函数值越大, 说明该施肥条件越有利于北苍术生长。由表 4 可知, 不同肥料配施下各指标的隶属均值均大于空白组 T0, 北苍术根茎倍半萜类成分含量的隶属函数从小到大依次为 $T0 < T5 < T9 <$

$T8 < T1 < T7 < T4 < T2 < T3 < T6$ 。说明不同肥料配施直接影响北苍术根茎倍半萜类成分积累, 适宜的氮磷钾配施可以积极作用北苍术生长, 基于此分析, T6 ($N_2P_3K_1$) 方案效果最优。

3.2 肥料配施对 2 种生物合成关键酶基因活性和表达量的影响

3.2.1 不同氮、磷、钾配施对北苍术关键酶 HMGR 活性的影响 北苍术种苗基础关键酶 HMGR 活性为 (63.38 ± 1.19) U/L。由图 6 可知, 不同肥料配施下, 北苍术关键酶 HMGR 活性在移栽 30~90 d 呈下降趋势, 90~120 d 无显著变化, 移栽 150 d 较 120 d 整体呈上升趋势。移栽 150 d 时关键酶 HMGR 的活性范围在 64.530 0~96.388 0 U/L, 达到了相较于整表 4 不同氮磷钾配方施肥下北苍术根茎倍半萜类成分含量的隶属函数分析

Table 4 Membership function analysis of content of sesquiterpenes in rhizomes of *A. chinensis* under different NPK fertilization

编号	质量分数/%			隶属均值
	苍术酮	白术内酯 II	β -桉叶醇	
T0	0	0.03	0	0.01
T1	0.68	0.32	0.07	0.36
T2	0.76	1.00	0.42	0.73
T3	0.99	0.64	0.69	0.77
T4	0.86	0.10	0.54	0.50
T5	0.34	0.06	0.05	0.15
T6	1.00	0.44	1.00	0.81
T7	0.21	0.60	0.62	0.48
T8	0.40	0	0.54	0.31
T9	0.52	0.07	0.18	0.26

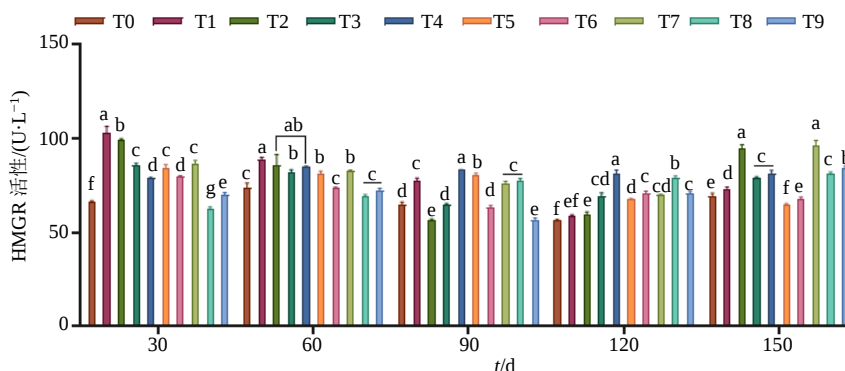


图 6 不同氮磷钾配施对北苍术关键酶 HMGR 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effects of combined application of nitrogen, phosphorus and potassium on HMGR activity of *A. chinensis* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

个时期的较高水平。T4 施肥方案在移栽 30~150 d 关键酶 HMGR 活性较高，特别是移栽 60~150 d，关键酶 HMGR 活性分别是 84.857 9、83.273 2、81.579 2、81.415 3 U/L，是空白组 T0 的 1.15、1.29、1.44、1.17 倍。纵观整个生长期，T4 施肥方案下，发育期内 HMGR 活性相较于其他方案表现为更高水平，推测此方案影响倍半萜类成分的生物合成，说明合理的施肥方案可以提高酶活性，促进北苍术次生代谢。

3.2.2 不同氮磷钾配施对北苍术关键酶 FPPS 活性的影响 北苍术种苗基础关键酶 FPPS 活性为 (326.67 ± 8.90) U/mL。根据图 7 可知，不同肥料配施下，移栽 30~90 d 后关键酶 FPPS 活性呈现下降趋势，移栽 30d 的关键酶 FPPS 活性差异最显著，活性范围 426.111 1~582.777 8 U/mL。移栽 120~150 d，各方案下的北苍术根茎中 FPPS 活性与 90 d 相比整体呈上升趋势。其中 T6 方案在所有施肥方案中 FPPS 活性水平相对较高，特别在 60~150 d

阶段，分别为 553.333 3、423.958 3、577.916 7、531.388 9 U/mL，是空白组的 1.06、1.52、1.16、2.56、1.14 倍。由上可知，T6 施肥方案下北苍术根茎中关键酶 FPPS 活性较高，结合对 HMGR 活性的分析，可以发现不同酶对倍半萜类成分合成的促进作用可能不同，合理的肥料配施对北苍术生长发育有促进作用。

3.2.3 不同氮磷钾配施对北苍术关键酶基因 HMGR 表达量的影响 基因相对表达量以种苗基础表达量为单位进行计算（下同）。由图 8 可知，不同肥料配施下，北苍术根茎中关键酶基因 HMGR 相对表达量在移栽 30~120 d 呈现下降趋势。移栽 150 d 时，各处理组关键酶基因 HMGR 相对表达量较前阶段整体呈上升趋势，范围在 2.568 7~11.463 7。

T4 施肥方案在移栽 30~150 d 各个时期关键酶 HMGR 相对表达量处于较高水平，特别是在移栽 60~150 d 这个时期，T4 施肥方案下关键酶基因 HMGR 相对分别是 11.9921、9.254 3、6.465 0、

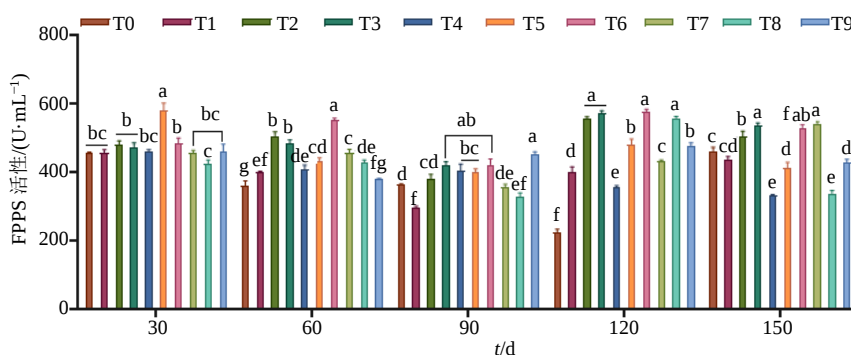


图 7 不同氮磷钾配施对北苍术关键酶 FPPS 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effects of combined application of nitrogen, phosphorus and potassium on FPPS activity of *A. chinensis* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

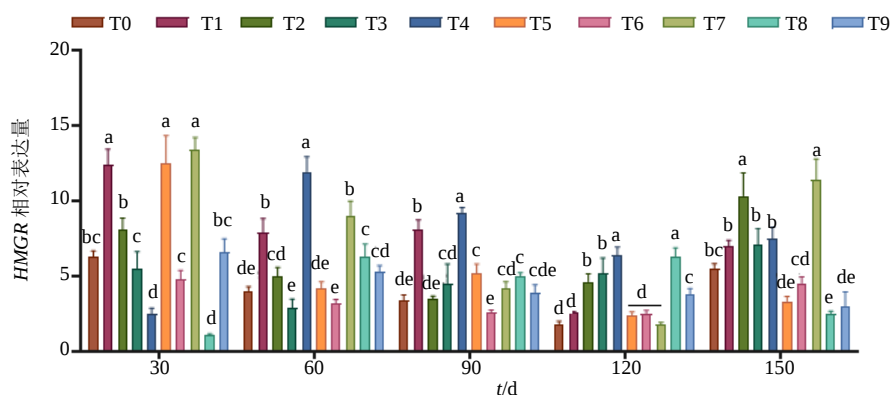


图 8 不同氮磷钾配施对北苍术关键酶基因 *HMGR* 表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Effects of combined application of nitrogen, phosphorus and potassium on *HMGR* expression in *A. chinensis* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

7.544 44, 是空白组的 2.93、2.70、3.43、1.35 倍。综上分析可知,北苍术根茎中关键酶基因 *HMGR* 相对表达量与活性存在同样的变化趋势,即在 T4 施肥方案下,关键酶基因 *HMGR* 表达量发育期内表达最高,进一步说明此方案积极影响倍半萜类成分生物合成。

3.2.4 不同氮磷钾配施对北苍术关键酶基因 *FPPS* 表达量的影响 由图 9 可知,从整体上看,移栽 30~150 d 的北苍术在不同肥料配比处理下,各方案根茎中关键酶基因 *FPPS* 相对表达量呈现先下降后升高的趋势,且移栽 90 d 时,各方案下的关键酶基因 *FPPS* 相对表达量较低,范围为 1.570 3~3.971 6。不同方案在移栽 120 d 和 150 d 时关键酶基因 *FPPS* 相对表达量整体呈上升趋势, T3、T4、T5、T6、T7 试验组的关键酶基因 *FPPS* 相对表达量在移栽 150 d 时较前一时期增加,范围在 6.789 2~12.705 5。

由此分析,不同施肥方案下的北苍术根茎中关键酶基因 *FPPS* 表达量变化程度不同,但变化趋势与其活性的整体变化趋势相似,证明了关键酶基因的表达可以调控酶活性,以便深入研究北苍术倍半萜类成分的生物合成。

3.3 肥料配施对北苍术 3 种倍半萜类成分及 2 种生物合成关键酶基因表达相关性分析

根据北苍术生长发育期苍术酮、白术内酯 II、 β -桉叶醇含量,关键酶 *HMGR*、关键酶 *FPPS* 活性及关键酶基因 *HMGR*、*FPPS* 相对表达量变化,对北苍术 3 种倍半萜类成分含量和 2 种生物合成关键酶活性及基因表达量进行相关性分析,结果见表 5。

相关性分析结果(表 5)表明,倍半萜类成分苍术酮、白术内酯 II 和 β -桉叶醇之间相关程度不同,其中白术内酯 II 与 β -桉叶醇的相关性(相关系数 0.564),较白术内酯 II 与苍术酮的相关性(相关系

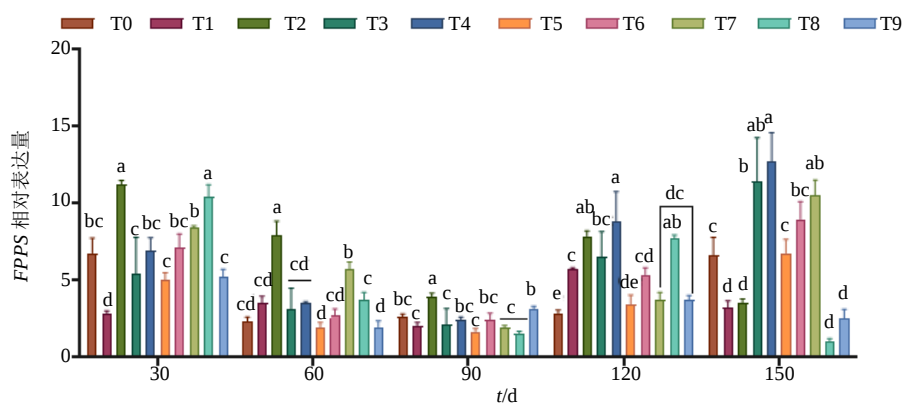


图 9 不同氮磷钾配施对北苍术关键酶基因 *FPPS* 表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 9 Effects of combined application of nitrogen, phosphorus and potassium on expression of *FPPS* gene in *A. chinensis* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表 5 不同氮磷钾配施下北苍术倍半萜类成分与关键酶活性及基因表达量相关性分析

Table 5 Correlation analysis of sesquiterpene components with key enzyme activities and gene expression in *A. chinensis* under different combined applications of nitrogen, phosphorus and potassium

指标	相关系数						
	苍术酮	白术内酯 II	β -桉叶醇	HMGR	FPPS	HMGR/EF-1 α	FPPS/EF-1 α
苍术酮	1.000 0						
白术内酯 II	0.291 0*	1.000					
β -桉叶醇	0.041 7	0.564**	1.000				
HMGR	0.198 0	0.395**	0.306*	1.000 0			
FPPS	-0.059 7	0.500**	0.659**	0.162 0	1.000		
HMGR/EF-1 α	0.290 0*	0.222	0.330*	0.624 0**	0.131	1.000	
FPPS/EF-1 α	0.279 0*	0.382**	0.452**	0.067 9	0.495**	0.219	1.000

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

数 0.291) 更显著。关键酶 HMGR 和 FPPS 活性及相对表达量之间无显著相关关系, 说明了 HMGR 和 FPPS 基因相互独立表达。HMGR 和 FPPS 基因和相对应的酶之间则均表现出极显著正相关 ($P < 0.01$), 其中关键酶 FPPS 活性与对应基因相对表达量相关系数略低 (相关系数 0.495)。根据 3 种倍半萜类成分与 2 种关键酶及基因的相关性可知, 苍术酮与关键酶 HMGR 和 FPPS 的基因表达量均呈显著相关 ($P < 0.05$), 说明北苍术根茎中苍术酮的合成同时受到这 2 种基因的影响。白术内酯 II 与 2 种关键酶 HMGR 和 FPPS 活性均呈极显著正相关 ($P < 0.01$), 与关键酶 HMGR 活性相关性 (相关系数 0.395) 略小于与 FPPS 活性相关性 (相关系数 0.500); 白术内酯 II 与关键酶基因 FPPS 正相关关系较强 ($P < 0.05$), 说明白术内酯 II 的生物合成与关键酶 FPPS 有关。 β -桉叶醇与 2 种关键酶及其基因相关程度不同, 与关键酶 FPPS 活性及基因表达量的相关性 ($P < 0.01$), 较与关键酶 HMGR 活性与基因表达量的相关性更显著 ($P < 0.05$), 说明关键酶 FPPS 较 HMGR 在 β -桉叶醇的生物合成中作用更明显。综上可知, 北苍术根茎中倍半萜类成分苍术酮、白术内酯 II 和 β -桉叶醇的生物合成受到多种基因及酶的调控, 其中关键酶 FPPS 调控作用较强。

4 讨论

肥效管理是中药材田间科学管理的关键要素之一, 环境对于药用植物的药效物质也起到一定的决定作用, 科学合理的施肥能有效增加药材产量和改善药材品质^[14-15]。逯莉等^[16]研究发现, 用微生物肥和农家肥等量配比进行施肥, 可以获得优质高产的黄精。药用植物的栽培种植不仅要保证经济产量,

更应重视药材内在质量。研究表明^[11]不同氮、磷、钾配方施肥下北苍术根茎中苍术酮、白术内酯 II 和 β -桉叶醇的含量均有显著性增加, 而且各有效成分的变化与产量变化均呈正相关, 与氮、磷、钾的用量变化存在交互效应, 说明合理的氮、磷、钾配方施肥可以保证北苍术高产优质。本研究发现, 不同氮、磷、钾配施下北苍术在生长发育过程中, 关键酶 HMGR 和 FPPS 活性及基因表达量差异显著, 说明合理施肥对促进北苍术的次生代谢具有重要作用, 对北苍术的药材品质有影响。Wang 等^[17]对药用植物黄花蒿的研究中发现 HMGR 基因和 FPPS 基因单个过表达及同时过表达对倍半萜类成分青蒿素含量的提高均有显著作用。丁逸雪等^[18]对白术倍半萜成分的研究中发现高经度、低纬度、高海拔的环境有利于白术倍半萜成分的积累, 说明药用植物生长发育具体情况及环境条件的变化对次生代谢产物积累具有重要作用, 对倍半萜的积累量影响显著。另外, 关键酶 FPPS 及其基因与苍术酮、白术内酯 II、 β -桉叶醇含量的正相关关系, 以及在一定的肥料配施下, 关键酶 HMGR 和 FPPS 活性及其基因表达量显著提高, 进一步说明其在倍半萜类成分合成途径上具有重要的调控作用, 合理施肥对促进北苍术的次生代谢具有重要作用。董天旺^[19]研究发现, 生物有机肥和氮、磷肥合理配施显著促进了太白贝母的生长和生物碱的积累量, 说明了科学合理的肥料配施是药材品质的保障。肖婉君等^[20]研究发现, 肥料施用对当归药材有显著的增效作用, 可以改善药材性状, 提高当归的产量和质量。袁勇等^[21]也做过相关探讨, 指出科学施肥, 补充营养元素, 是提高中药材质量的重要措施, 氮、磷、钾的合理施用

可以促进营养成分、有效成分的合成与积累。

综上所述, 本研究发发现北苍术根茎中倍半萜类成分苍术酮、白术内酯 II 和 β -桉叶醇的生物合成受到多种基因及酶的调控, 其中关键酶 FPPS 发挥了较大的调控作用。科学合理的肥料配施可促进北苍术倍半萜类成分含量的增加, 并显著提高其生物合成关键酶 HMGR 和 FPPS 的活性及基因表达。因此, 在北苍术的栽培种植过程中, 合理的肥料配施可以提高北苍术倍半萜成分的积累, 保障其质量。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 236.
- [2] 王艺萌, 王知斌, 孙延平, 等. 苍术属植物中倍半萜类化合物化学结构和生物活性研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(1): 299-309.
- [3] 赵建华, 赵重阳, 孙成振, 等. 北苍术转录组分析及倍半萜类生物合成关键基因挖掘 [J]. 植物生理学报, 2020, 56(7): 1458-1466.
- [4] Yin M, Xiao C C, Chen Y, et al. A new sesquiterpenoid glycoside from rhizomes of *Atractylodes lancea* [J]. *Chin Herb Med*, 2015, 7(4): 371-374.
- [5] 李涵, 金香环, 赵百慧, 等. 北苍术的化学成分及药理活性的研究进展 [J]. 吉林农业, 2019(3): 72-73.
- [6] 孙金, 翁丽丽, 肖春萍, 等. HPLC-一测多评法结合色差原理分析不同生长年限北苍术药材的质量 [J]. 中国药房, 2020, 31(11): 1314-1319.
- [7] 杨国, 李鸿慧, 金叶飞, 等. 基于转录组分析白术倍半萜生物合成的相关基因 [J]. 植物生理学报, 2019, 55(12): 1827-1838.
- [8] Figueroa-Balderas R E, García-Ponce B, Rocha-Sosa M. Hormonal and stress induction of the gene encoding common bean acetyl-coenzyme A carboxylase [J]. *Plant Physiol*, 2006, 142(2): 609-619.
- [9] Qian J Y, Liu Y, Chao N X, et al. Positive selection and functional divergence of farnesyl pyrophosphate synthase genes in plants [J]. *BMC Mol Biol*, 2017, 18(1): 3.
- [10] Liu X M, Tao T T, Meng X X, et al. Cloning and expression analysis of a farnesyl diphosphate synthase (FPPS) gene from *Chamaemelum nobile* [J]. *Not Bot Horti Agrobo*, 2017, 45(2): 358-364.
- [11] 孙金, 翁丽丽, 肖春萍, 等. 氮磷钾配方施肥对北苍术生长及有效成分含量的影响 [J]. 北方园艺, 2021(3): 128-135.
- [12] 陆奇杰, 巢建国, 谷巍, 等. 铜胁迫对茅苍术 3 种药效成分积累及其生物合成 2 种关键酶基因表达的影响 [J]. 中草药, 2019, 50(3): 710-715.
- [13] 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.
- [14] Tsusaka T, Makino B, Ohsawa R, et al. Genetic and environmental factors influencing the contents of essential oil compounds in *Atractylodes lancea* [J]. *PLoS One*, 2019, 14(5): e0217522.
- [15] 葛阳, 康传志, 万修福, 等. 生产中氮肥施用及其对中药材产量和质量的影响 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(8): 1883-1892.
- [16] 逯莉, 常晖, 介磊, 等. 不同肥料对黄精药材品质的影响分析 [J]. 陕西农业科学, 2019, 65(12): 65-67.
- [17] Wang Y Y, Jing F Y, Yu S Y, et al. Co-overexpression of the HMGR and FPS genes enhances artemisinin content in *Artemisia annua* L. [J]. *J Med Plants Res*, 2011, 5: 3396.
- [18] 丁逸雪, 徐继校, 吴威, 等. HPLC 法同时测定白术中 4 种倍半萜 [J]. 中成药, 2020, 42(4): 927-931.
- [19] 董天旺. 氮磷肥与微生物肥料配施对 2 年生太白贝母生长及品质的影响 [D]. 西安: 西北农林科技大学, 2018.
- [20] 肖婉君, 郭凤霞, 陈垣, 等. 施用有机肥对当归药材性状、产量及抗病性的影响 [J]. 草业学报, 2021, 30(3): 189-199.
- [21] 袁勇, 黄慧莲, 刘贤旺. 无机肥料对中药有效成分含量的影响 [J]. 江西林业科技, 2000, 28(1): 29-30.

[责任编辑 时圣明]