

不同产地桔梗皂苷生物合成与土壤元素关系的研究

孙雨默^{1,2}, 程 林^{1,2*}, 韩 梅^{1,2*}, 杨利民^{1,2}

1. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

2. 省部共建生态恢复与生态系统管理国家重点实验室, 吉林 长春 130118

摘要:目的 研究桔梗皂苷积累与土壤元素的关系, 从基因表达水平明确不同产地桔梗皂苷含量差异的原因, 为桔梗药材的科学种植提供理论依据。方法 利用 HPLC 法和香草醛-冰醋酸比色法测定不同产地桔梗韧皮部和木质部的桔梗皂苷 D 和桔梗总皂苷含量, 实时荧光定量 PCR 测定 6 种关键酶基因的表达式, 利用原子吸收法、比色法等方法测定土壤元素含量, 用 Pearson 相关性分析法分析土壤元素与桔梗皂苷及其关键酶基因表达量的关系。结果 河南洛阳产桔梗根中的桔梗皂苷 D 和桔梗总皂苷含量显著高于其他产地, 桔梗韧皮部和木质部的桔梗皂苷含量和关键酶基因表达式存在较大差异; 相关性分析表明, 土壤中 Cu、Ca 和 Zn 含量对桔梗皂苷的合成起主要作用, 甲羟戊酸焦 P 酸脱羧酶基因、法尼基焦 P 酸合酶基因和异戊烯基焦 P 酸异构酶基因是桔梗皂苷合成过程中的主要关键酶基因, 土壤元素对桔梗关键酶基因具有一定的调控作用。结论 土壤元素通过调控关键酶基因进而影响桔梗皂苷的合成, 其中土壤中 Zn 含量起主要作用。

关键词: 桔梗; 桔梗皂苷 D; 桔梗总皂苷; 基因表达; 土壤元素; 甲羟戊酸焦 P 酸脱羧酶; 法尼基焦 P 酸合酶; 异戊烯基焦 P 酸异构酶
中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)15-4844-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.15.028

Effects of soil elements on platycodin biosynthesis process in *Platycodon grandiflorum* from different habitats

SUN Yu-mo^{1,2}, CHENG Lin^{1,2}, HAN Mei^{1,2}, YANG Li-min^{1,2}

1. College of Chinese materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2. State Key Laboratory of Ecological Recovery and Ecosystem Management, Changchun 130118, China

Abstract: Objective To explore the relationship between platycodin accumulation and soil elements, to identify the reasons for the the content difference of *Platycodon grandiflorum* between different origins from the gene expression level, and to provide a theoretical basis for the scientific cultivation of *P. grandiflorum*. **Methods** The content of platycodin D and total platycodin in phloem and xylem from different habitats were determined by HPLC and vanilla aldehyde-glacial acetic acid colorimetric, the expression of key enzyme genes were determined by real-time quantitative PCR, the content of soil elements were determined by Atomic Absorption Method. And the relationship between soil elements and the expression levels of platycodin and its key enzyme genes was analyzed by Pearson correlation analysis. **Results** The content of platycodin D and total platycodin from Luoyang, Henan, was significantly higher than those of other habitats; Platycodin content and expression of key enzyme genes in phloem and xylem of *P. grandiflorum* were quite different; Contents of Cu, Ca and Zn in soil play a major role in the synthesis of platycodin, mevalonate pyrophosphate decarboxylase gene (*MVD*), farnesyl pyrophosphate synthase gene (*FPPS*) and isopentenyl diphosphate isomerase gene (*IPPI*) genes were the main key enzyme genes in the synthesis of platycodin; Soil elements had a certain regulatory effect on the expression of key enzyme genes. **Conclusion** Soil elements affect the synthesis of platycodin by regulating key enzyme genes, with Zn content in the soil playing a major role.

Key words: *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A.DC.; platycodin D; total platycodin; gene expression; soil elements; mevalonate pyrophosphate decarboxylase; farnesyl pyrophosphate synthase; isopentenyl diphosphate isomerase

收稿日期: 2021-12-06

基金项目: 国家中药材产业技术体系项目 (CARS-21)

作者简介: 孙雨默 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为生态学。E-mail: 454091276@qq.com

*通信作者: 程 林 (1988—), 男, 博士, 研究方向为药用植物次生代谢生态调控研究。E-mail: idream9999@126.com

韩 梅 (1964—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为资源植物生态与质量调控研究。E-mail: hanmei77@sohu.com

桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. 为桔梗科多年生草本植物,有宣肺、祛痰、利咽、排脓等功效^[1]。主要分布于东北、华北、华东、华中及西南地区,桔梗皂苷 D 是桔梗中主要质控成分^[2]。研究发现,不同产地桔梗皂苷含量差异较大^[3-5]。

生态环境是影响中药材质量形成的重要因素,生态环境主要指气候、土壤、地质等生态因子^[6-9],其中土壤因子对植物的生长发育有较大影响,植物生长发育所需要的大部分营养均来自于土壤,杨月等^[10]研究发现土壤无机元素通过影响三七药材中无机元素含量影响三七药材品质;王升等^[11]研究发现黄芩对各元素的吸收能力受产地的影响较大,黄芩对无机元素的吸收与各产地根际土壤无机元素有一定关联性;因此研究土壤元素对桔梗皂苷的合成具有重要意义。

除生态因素外,遗传因素对中药材质量的形成也具有重要作用,目前已有研究发现了桔梗皂苷的合成通路及其合成过程中的关键酶基因^[12-14],主要包括:3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶基因(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase gene, *HMGR*)^[15-16];乙酰辅酶 A 酰基转移酶基因(acetyl-CoA acetyltransferase gene, *AACT*)^[17];甲羟戊酸焦 P 酸脱羧酶基因(mevalonate pyrophosphate decarboxylase gene, *MVD*)^[18];异戊烯基焦 P 酸异构酶基因(isopentenyl diphosphate isomerase gene, *IPPI*)^[19-20];法尼基焦 P 酸合酶基因(farnesyl pyrophosphate synthase gene, *FPPS*)^[21];鲨烯合成酶基因(squalene synthase gene, *SS*)等^[22-23]。虽然已经发现了桔梗皂苷合成过程中的关键酶基因,但是其作用机制尚不明晰,关于生态环境对桔梗皂苷合成过程中关键酶基因的影响也未见报道。

本研究以 11 个产地桔梗及其土壤为材料,测定了不同产地桔梗韧皮部和木质部的桔梗皂苷 D 和桔梗总皂苷含量及其 6 种关键酶基因的相对表达量和土壤元素含量,并对桔梗皂苷含量与关键酶基因表达量和土壤元素进行了 Pearson 相关性分析,以期找到不同产地桔梗皂苷含量不同的主要影响因素,为桔梗的合理栽培提供理论依据。

1 材料与器材

1.1 材料

桔梗样品为本课题组于 2017 年和 2018 年 9~10 月份采集,共 11 个不同产地,主要分布于吉林省、河南、河北、山西、内蒙古。所有样品由杨利民教授鉴定为桔梗 *P. grandiflorum* (Jacq.) A. DC. 的根,样地信息见表 1。此次采样采用 5 点采样法,并用环刀采集土壤 3 份。

1.2 主要试剂

对照品桔梗皂苷 D (批号 A0217AS)、香草醛 (批号 A0219AS) 购于大连美伦生物技术有限公司,质量分数>98%;多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒生产自北京庄盟国际生物基因科技有限公司, Bioteke Super RT Kit cDNA 合成试剂盒购于北京百泰克生物技术有限公司, TB Green™ Premin Ex Taq™ 荧光染料购于 TaKaRa 公司等。

1.3 主要仪器

Agilent1260 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司), AUY220 型电子天平 (日本岛津公司), 电热恒温水浴锅 (北京市光明医疗仪器有限公司), Mx3000P 型荧光定量 PCR 仪 (美国 Aligent 公司), NanoDrop 2000 型核酸/蛋白定量仪 (美国 Thermo 公司), MDF-382E 型超低温冰箱 (日本 SANYO 公司), SIM-F140 型制冰机 (日本 SANYO 公司)。

表 1 样地信息

Table 1 Plot information

样地编号	样地名称	地理坐标	海拔高度/m	采收日期	年生
J1	吉林长春	N43°48'24" E125°24'59"	251	2017-09-12	2
J2	河北承德	N41°24'55" E117°33'5"	610	2017-09-11	2
J3	河南洛阳	N33°47'10" E112°6'11"	670	2017-09-18	2
J4	山西晋城	N35°43'40" E113°20'42"	1210	2017-09-18	2
J5	吉林松原	N44°36'54" E124°6'14"	350	2018-10-25	2
J6	内蒙赤峰宁城	N41°43'23" E119°17'10"	550	2018-10-13	2
J7	内蒙赤峰喀喇沁旗	N42°6'52" E118°47'32"	640	2018-10-13	2
J8	内蒙赤峰巴林右旗	N41°18'38" E119°8'6"	560	2018-10-14	2
J9	内蒙赤峰天义镇	N41°34'6" E119°12'04"	551	2018-10-26	2
J10	内蒙赤峰沙里镇	N41°43'23" E119°17'10"	553	2018-10-26	2
J11	内蒙赤峰红山区	N42°5'58" E118°57'2"	695	2018-10-26	2

2 方法

2.1 桔梗总皂苷含量的测定

2.1.1 供试品溶液的制备 取桔梗粉末 2 g (过筛 60 目), 精密称定, 精密加入 50% 甲醇 50 mL, 称定质量, 超声处理 (功率 250 W、频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 滤过, 再称定质量, 用 50% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 超声, 滤过, 定容至 25 mL 量瓶。

2.1.2 标准曲线的绘制 将香草醛对照品梯度稀释溶液在 576 nm 波长处比色测定各对照品稀释液吸光度 (A) 值。以浓度为横坐标 (X), A 值为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线 $Y=4.668X-0.0404$, $R^2=0.9984$ 。

2.1.3 总皂苷的测定 取待测液 1 mL 于锥形瓶中, 放置烘箱内 60 °C 挥干, 加入 5% (香草醛+冰醋酸) 显色剂 0.2 mL 和 0.8 mL 高氯酸, 70 °C 水浴加热 15 min, 快速拿出, 冰浴 3 min, 室温放置 5 min, 加 5 mL 冰醋酸, 使用紫外分光光度计 576 nm 处测得 A 值, 最后带入标准曲线, 计算桔梗总皂苷含量。

2.2 桔梗皂苷 D 含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 取桔梗皂苷 D 对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成 0.5 mg/mL 的溶液, 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 同“2.1.1”项。

2.2.3 色谱条件 色谱柱: C_{18} 分析柱 (250 mm×4.6 mm); 流动相为乙腈 (B)-P 酸 (A), 梯度洗脱 (0~20 min, 4% A; 20~35 min, 15%~23% A; 35~55 min, 23%~28% A; 55~65 min, 28%~40% A; 65~80 min, 40%~90% A); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 210 nm; 进样量 20 μ L。

2.2.4 标准曲线的建立 取桔梗皂苷 D 对照品溶液, 依次稀释得到初始浓度分别为 1/32、1/16、1/8、1/4、1/2、1/1 的混合对照品溶液。按照上述色谱条件, 依次进样 20 μ L, 以峰面积为纵坐标 (Y), 溶液质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 结果线性关系良好, 回归方程为 $Y=3.1385X-24.518$, $R^2=0.9996$ 。

2.2.5 方法学考察 精密度、稳定性、重复性及加样回收率试验考察符合要求, RSD 均小于 3%。

2.2.6 桔梗皂苷 D 含量测定 取“2.1.1”制备的供试样品, 过 0.45 μ L 微孔滤膜, 按照上述色谱条件进样 20 μ L, 将峰面积带入标曲, 求得桔梗皂苷 D

含量。

2.3 土壤元素测定

土壤速效氮采用碱解扩散法, 土壤速效 P 采用钼锑抗比色法, 土壤金属元素如速效 K、Fe、Cu、Zn、Mn、Ca 和 Me 采用原子吸收法。具体操作参考《土壤农化分析》^[24]。

2.4 关键酶基因表达量检测

2.4.1 桔梗根部总 RNA 的提取和 cDNA 的合成 取保存在-80 °C 冰箱中的不同产地桔梗韧皮部和木质部的鲜样 50~100 mg 置于干净的研钵中加入液氮充分研磨 20~25 min, 磨成细粉为止, 之后的步骤参照多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒用核酸蛋白检测仪测定 RNA 浓度和纯度。之后, 使用 Bioteke Super RT Kit cDNA 合成试剂盒将总 RNA 反转录合成 cDNA, 放入-20 °C 冰箱中保存备用。以上所有步骤均在冰上操作。

2.4.2 桔梗皂苷合成中关键酶基因表达量的测定 采用实时荧光定量 PCR 法, 通过查阅文献, 确定以 *GAPDH* 为内参基因, 选择了桔梗皂苷合成过程中的 6 种关键酶基因 (*AACT*、*HMGR*、*MVD*、*IPPI*、*FPPS*、*SS*) 为目的基因, 6 种关键酶基因和内参基因的引物序列见表 2, 并以吉林松原产地的韧皮部基因表达量为对照, 测定不同产地桔梗韧皮部和木质部关键酶基因表达量。反应体系: TB Green™ Premix Ex Taq™ 荧光染料 10 μ L, ddH₂O 7 μ L, 引物各 1 μ L, cDNA 1 μ L, 共 20 μ L, 每个反应重复 3 次。反应程序: 94 °C 预变性 30 s; 45 个循环 (94 °C 变性 5 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 20 s)。

表 2 基因引物序列

Table 2 Gene primer sequence

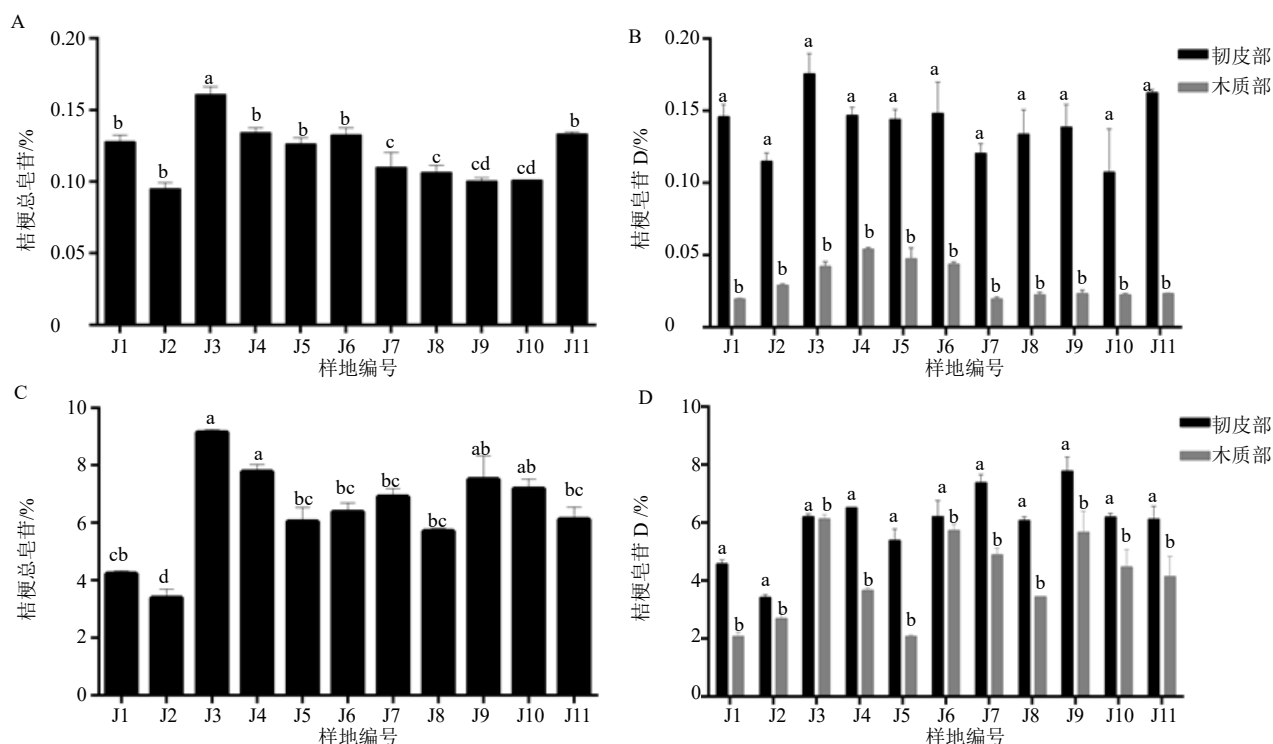
基因	序列 (5'-3')
<i>AACT</i>	F: CCTCAATACCCCAAGAGTGTC R: AATGAAGCCTTTGCTGTCGTC
<i>HMGR</i>	F: GGTGGGCGATAATCAAACCTAACTC R: CGAGGATGAATCGTGTGACTGT
<i>MVD</i>	F: ACATCTCCTTTGGATTCTCTGCG R: CTTCAAGAGGCTGCTTTTTCACCTT
<i>IPPI</i>	F: GCAACTTCGTCGGGATTTCG R: TGCTCTACAAGGCACCATCTGAC
<i>FPPS</i>	F: GCTACAAGTTGCTGAAAGGAGAAGA R: GGTTGACCTCGGCGTGTATG
<i>SS</i>	F: CGGATGATTTCTACCCGTTGTT R: CTGTTGAATAACGAGGGCGAAG
<i>GAPDH</i>	F: CAGGGAGGCTTTTAGTTTCAGGT R: ATCACATCTACCCCTCCAGC

3 结果与分析

3.1 不同产地桔梗皂苷含量分析

分别利用香草醛-冰醋酸比色法和 HPLC 法测定了不同产地桔梗韧皮部和木质部的桔梗总皂苷和桔梗皂苷 D 含量, 结果见图 1, 不同产地桔梗中桔梗皂苷含量差异较大, 图 1-A 为不同产地桔梗总皂苷含量 11 批桔梗样品中, 以河南洛阳 (J3)、山西晋城 (J4) 和内蒙古赤峰 (J6~J11) 样地的桔梗总皂苷含量较高, 质量分数在 6%~9%, 吉林长春 (J1) 和河北承德 (J2) 样地的桔梗总皂苷含量较低, 分别为 4.3%、3.2%; 图 1-B 为不同产地桔梗韧皮部和木质部桔梗总皂苷含量, 韧皮部的总皂苷含量显著高于木质部, 韧皮部与

木质部的质量比约为 6:1, 所以桔梗根部的总皂苷主要来自于韧皮部; 图 1-C 为不同产地桔梗皂苷 D 含量, 《中国药典》2020 年版规定桔梗皂苷 D 的含量为不小于 0.1%, 由图可知, 除了河北承德 (J2) 样地的桔梗皂苷 D 质量分数为 0.095%, 未达到药典标准, 其余产地桔梗皂苷 D 含量显著高于药典标准, 以河南洛阳 (J3) 样地的桔梗皂苷 D 质量分数最高为 0.153%, 是《中国药典》规定的 1.5 倍; 图 1-D 为桔梗韧皮部和木质部中桔梗皂苷 D 的含量, 桔梗韧皮部的桔梗皂苷 D 质量分数均显著高于木质部, 韧皮部的桔梗皂苷 D 质量分数是木质部的 2.66~2.98 倍, 所以桔梗根部的桔梗皂苷 D 也主要来自于韧皮部。



不同字母表示经 Duncan 氏法检验差异显著 ($P < 0.05$), 下同

Different letters in the same row by Duncan's new multiple range test ($P < 0.05$), same as blow

图 1 不同产地桔梗皂苷含量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Content of platycodin in different origins ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 不同产地桔梗土壤元素含量分析

不同产地桔梗土壤元素含量的结果见图 2, 图 2-A 为不同产地桔梗土壤碱解氮含量, 内蒙赤峰巴林右旗 (J8) 土壤中 N 含量最高, 参考全国土壤养分含量分级标准可知其 N 含量处于中等水平, 为 119 mg/kg 是其他产地的 1.7~2.72 倍, 其余样地的碱解氮含量处于缺乏水平; 图 2-B 为不同产地桔梗土壤 P 含量, 内蒙赤峰巴林右旗 (J8) 样地土壤 P 质量分数最高为

222.47 mg/kg, 是其他产地的 1.43~10.59 倍, 土壤 P 含量大于 40 mg/kg 即为很丰富水平, 因此除河北承德 (J2)、山西晋城 (J4) 和内蒙赤峰汐子镇 (J10) 样地 P 含量为丰富水平外, 其余样地均为很丰富水平; 图 2-C 为不同产地桔梗土壤 K 含量, 吉林长春 (J1) 样地的土壤 K 质量分数较高为 223.90 mg/kg, 处于很丰富水平, 其余产地土壤 K 质量分数范围是 103.61~189.213 mg/kg 均处于中等和丰富水平; 图 2-D、E、F

和 G 为不同产地桔梗土壤所含有有效微量元素 (Fe、Cu、Zn、Mn) 含量, 根据全国土壤有效微量元素分级指标可知河南洛阳 (J3) 样地土壤中的 Fe、Cu、Zn 和 Mn 元素含量显著高于其他产地, 分别为 35.86、2.427、28.00、40.79 mg/kg, 处于极高水平, 其余产地土壤 Fe、Zn 和 Mn 含量均较低, 处于中等水平, 内蒙赤峰宁城 (J6) 和内蒙赤峰天义镇 (J9) 样地的土壤 Cu 含量也较高, 处于极高水平, 是其他产地的 1.53~3.41 倍, 其他产地处于中等水平; 图 2-H 为不

同产地桔梗土壤 Ca 含量, 山西晋城 (J4) 样地的土壤 Ca 质量分数最高为 20 736.28 mg/kg, 是其他产地的 2.42~8.26 倍; 图 2-I 为桔梗不同产地土壤 Mg 含量, 河北承德 (J2) 和山西晋城 (J4) 样地的土壤 Mg 质量分数较低, 分别为 154.56 mg/kg 和 202.05 mg/kg, 其余产地土壤 Mg 含量较高, 其质量分数是 244.04~444.81 mg/kg。根据“3.1”项结果显示河南洛阳 (J3) 样地桔梗皂苷含量最高, 推测生长在微量元素为极高水平的土壤中更有利于桔梗皂苷的积累。

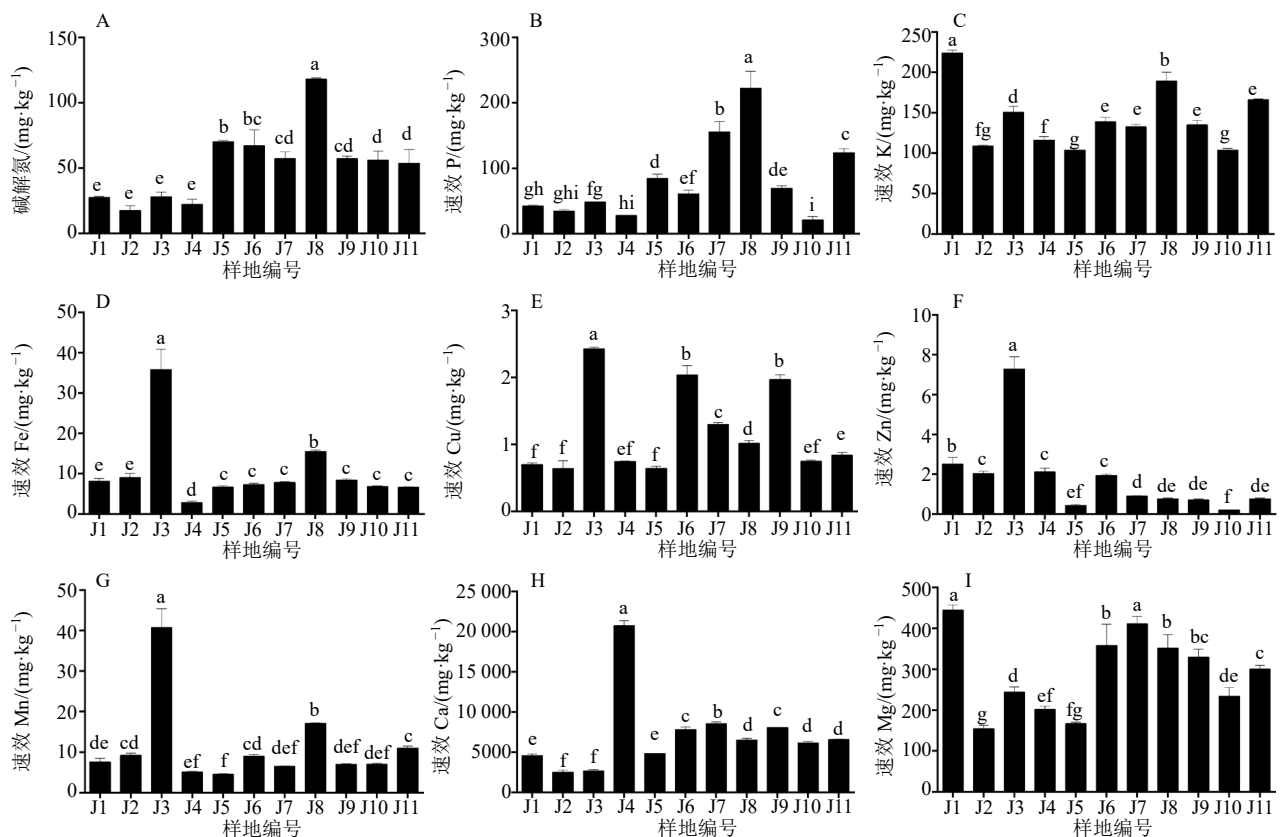


图 2 不同产地桔梗土壤元素含量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Soil element content of *P. grandiflorum* from different origins ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 不同产地桔梗土壤因子与桔梗皂苷相关性分析

采用 SPSS19.0 对不同产地桔梗土壤元素含量与桔梗皂苷含量进行 Pearson 相关性分析, 由表 3 可知, 桔梗木质部桔梗总皂苷含量与土壤 Cu 含量呈显著正相关 ($P < 0.05$), 说明桔梗木质部的桔梗总皂苷含量主要受土壤 Cu 含量的影响较大; 桔梗韧皮部的桔梗总皂苷含量与土壤 Ca 呈显著正相关 ($P < 0.05$), 桔梗根部桔梗总皂苷含量也与土壤 Ca 呈显著正相关 ($P < 0.05$), 可能因为桔梗根部的桔梗总皂苷主要来自于桔梗的韧皮部, 且桔梗总皂

苷的积累与土壤 Ca 密切相关; 桔梗根部桔梗皂苷 D 含量与土壤 Zn 含量呈显著正相关 ($P < 0.05$), 说明桔梗根部桔梗皂苷 D 含量受土壤 Zn 含量影响较大。

3.4 桔梗皂苷合成过程中关键酶基因表达量

桔梗皂苷 D 是评价桔梗质量的关键因素, 根据“3.1”项的研究, 按照桔梗皂苷 D 含量高低将产地进行排序为河南洛阳 > 山西晋城 > 内蒙赤峰红山区 > 内蒙赤峰宁城 > 吉林长春 > 吉林松原 > 内蒙赤峰喀喇沁旗 > 内蒙赤峰巴林右旗 > 内蒙赤峰沙子镇 > 内蒙赤峰天义镇 > 河北承德, 其中河北承德 (J2) 样地的桔梗皂苷 D 含量未达到药典标准。韧皮部的皂

表 3 土壤元素与桔梗皂苷含量的相关性分析

Table 3 Correlation between soil elements and platycodin content

不同部位皂苷	相关系数								
	碱解氮	速效 P	速效 K	速效 Fe	速效 Cu	速效 Zn	速效 Mn	速效 Ca	速效 Mg
木质部桔梗皂苷 D	-0.086	-0.378	-0.445	0.085	0.235	0.368	0.129	0.429	-0.572
韧皮部桔梗皂苷 D	-0.065	-0.201	0.174	0.406	0.211	0.566	0.502	-0.005	-0.040
木质部桔梗总皂苷	-0.178	-0.100	-0.339	0.068	0.618*	0.021	0.106	-0.047	0.010
韧皮部桔梗总皂苷	0.041	0.213	-0.247	-0.091	0.309	-0.152	-0.094	0.627*	0.060
根部桔梗皂苷 D	0.050	-0.199	0.281	0.442	0.378	0.658*	0.528	0.113	-0.007
根部桔梗总皂苷	-0.061	0.005	-0.402	-0.147	0.321	-0.183	-0.124	0.616*	-0.033

*相关性显著 ($P < 0.05$); **相关性极显著 ($P < 0.01$), 下同

*Correlation is significant ($P < 0.05$); **correlation is very significant ($P < 0.01$), same as below

苷含量显著高于木质部, 说明韧皮部是桔梗皂苷 D 储存的重要位置。桔梗韧皮部和木质部的关键酶基因表达量结果见图 3, 以 *GAPDH* 基因为内参基因, 吉林松原 (J5) 样地的桔梗皂苷含量相对于其他样地处于中等水平, 因此以吉林松原 (J5) 样地桔梗的韧皮部的关键酶基因表达量为对照。从图 3(A-F)

中发现, 不同产地的韧皮部和木质部的关键酶表达量表达模式不同, *HMGR* 基因在木质部中的表达量均高于韧皮部, 大部分样地的 *AAC*、*MVD*、*IPP* 和 *FP* 基因在韧皮部的表达量高于木质部, 然而未达到药典标准的河北承德 (J2) 样地, 有 5 个基因 (*AAC*、*HMGR*、*MVD*、*FP*、*SS*) 在

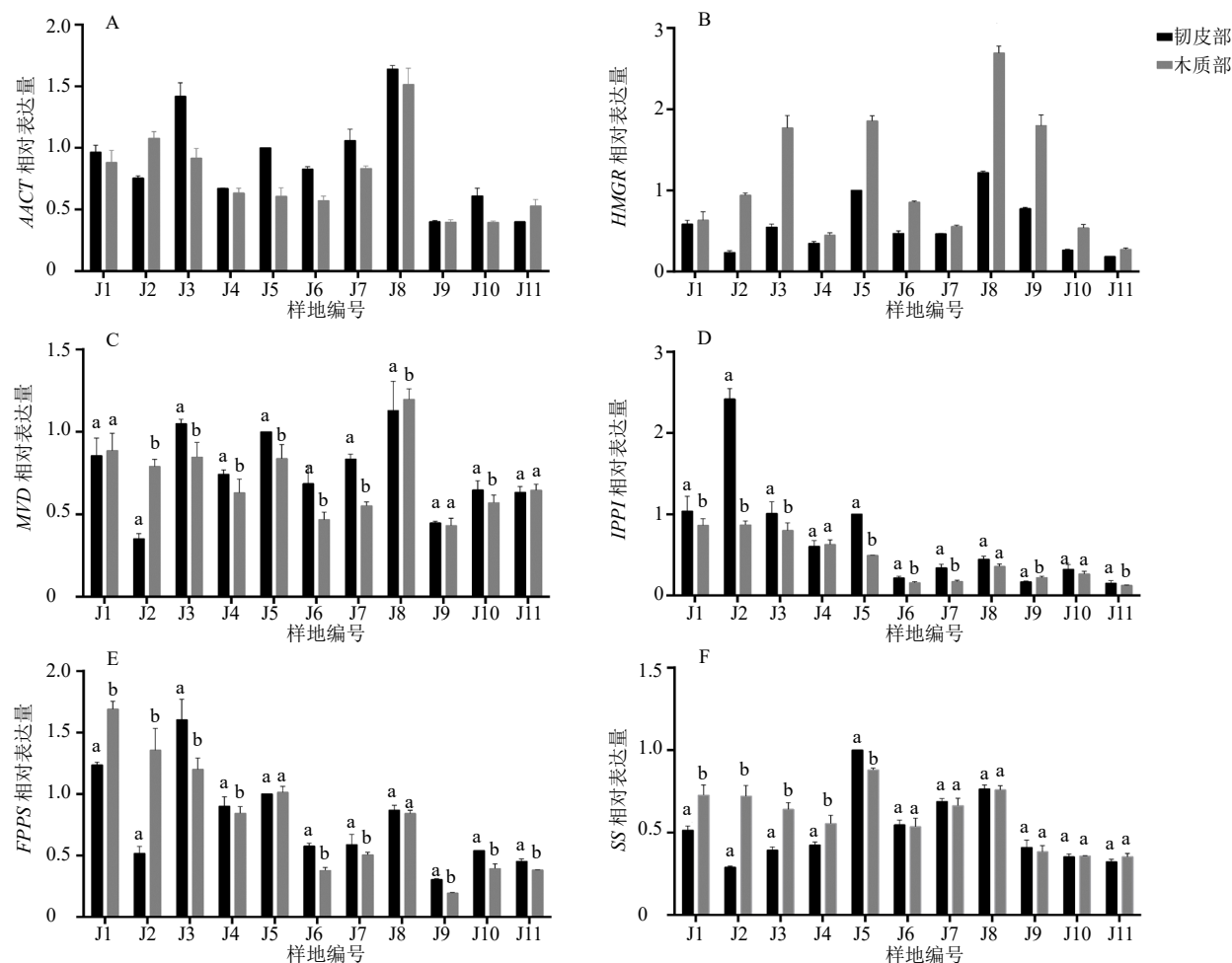


图 3 桔梗皂苷合成的关键酶基因表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Gene expression of key enzymes in synthesis of platycodin ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

木质部的表达量高于韧皮部,可能是这些基因在其韧皮部的表达量较低,导致河北承德(J2)样地韧皮部桔梗皂苷 D 积累不足,未达到药典标准。同时,河北承德(J2)样地的 *IPPI* 基因在桔梗韧皮部的表达量显著高于木质部,而其他样地的桔梗韧皮部和木质部的 *IPPI* 表达量大致相同,这种不正常的表达,可能对皂苷的积累产生了抑制作用。

3.5 桔梗皂苷含量与关键酶基因表达量的相关性分析

采用 SPSS19.0 对不同产地桔梗皂苷含量与关键酶基因表达量进行 Pearson 相关性分析见表 4,木质部的桔梗总皂苷含量与 *MVD*、*FPPS* 和 *IPPI* 基因呈显著负相关($P<0.05$),说明这 3 个基因在木质部中的过度表达对桔梗皂苷的合成产生了抑制作用,桔梗根部桔梗皂苷 D 含量与 *MVD* 和 *IPPI* 基因呈显著正相关($P<0.05$),与 *FPPS* 基因呈极显著正相关

($P<0.01$),说明 *MVD*、*IPPI* 和 *FPPS* 基因的表达对桔梗根部桔梗皂苷 D 的合成起主要调控作用。

3.6 土壤因子与关键酶基因表达量的相关性分析

采用 SPSS19.0 对不同产地桔梗土壤元素与关键酶基因表达量进行 Pearson 相关性分析见表 5,土壤碱解氮、速效 P 和速效 Fe 含量与 *AACT* 基因的表达量呈极显著正相关($P<0.01$),土壤速效 Mn 含量与 *AACT* 基因成显著正相关($P<0.05$)土壤说明土壤碱解氮、速效 P、速效 Fe 和速效 Mn 含量对 *AACT* 基因的表达有促进作用;土壤速效 Zn 和速效 Mn 含量与 *FPPS* 基因呈显著负相关($P<0.05$),说明土壤速效 Zn 和速效 Mn 含量对 *FPPS* 基因的表达有促进作用;其他土壤元素对关键酶基因表达量有一定的影响,但是相关性不显著,可能是生态因子相互作用,共同影响关键酶基因的表达量,需要进一步的研究。

表 4 桔梗皂苷含量与关键酶基因的相关性

Table 4 Correlation between the content of platycodin content and key enzyme genes

不同部位皂苷	相关系数					
	<i>AACT</i>	<i>HMGR</i>	<i>MVD</i>	<i>SS</i>	<i>FPPS</i>	<i>IPPI</i>
木质部桔梗皂苷 D	-0.181	0.059	-0.072	0.225	0.104	0.243
韧皮部桔梗皂苷 D	-0.139	-0.302	0.432	-0.083	0.597	-0.157
木质部桔梗总皂苷	-0.584	-0.044	-0.647*	-0.546	-0.734*	-0.654*
韧皮部桔梗总皂苷	0.121	0.232	0.220	0.260	-0.095	-0.700
根部桔梗皂苷 D	-0.136	0.059	0.700*	0.090	0.859	0.720*
根部桔梗总皂苷	-0.255	0.123	0.306	-0.154	0.275	0.229

表 5 土壤元素与关键酶基因的相关性

Table 5 Correlation between the content of Soil elements and key enzyme genes

元素	相关系数					
	<i>HMGR</i>	<i>AACT</i>	<i>MVD</i>	<i>IPPI</i>	<i>FPPS</i>	<i>SS</i>
碱解氮	0.437	0.847**	0.548	-0.139	0.419	0.339
速效 P	0.397	0.803**	0.488	-0.194	0.272	0.354
速效 K	0.260	0.447	0.473	-0.164	0.453	0.092
速效 Fe	0.241	0.722**	0.454	-0.031	0.482	0.156
速效 Cu	-0.114	0.344	0.209	-0.307	0.290	-0.075
速效 Zn	-0.100	-0.157	0.233	0.321	0.662*	-0.295
速效 Mn	0.183	0.638*	0.525	0.000	0.610*	0.060
速效 Ca	0.353	-0.232	-0.121	-0.366	-0.207	-0.076
速效 Me	0.077	0.107	0.179	-0.491	-0.033	0.113

4 讨论

药用植物不同部位有效成分含量存在一定的差异,李小莹等^[25]研究发现,鸡血藤木质部的黄酮类药效成分成分高于韧皮部;本研究发现,不同产地桔梗韧皮部的桔梗总皂苷和桔梗皂苷 D 含量均高于木质部;不同产地桔梗根中桔梗总皂苷和桔梗皂苷 D 含量存在较大差异,其中河南洛阳(J3)样地桔

梗总皂苷和桔梗皂苷 D 含量最高,河北承德(J2)样地桔梗皂苷 D 含量最低,未达到药典标准,不同产地桔梗皂苷含量差异可能与土壤、温度、光照、降雨量等生态因子密切相关。

本实验分析了土壤元素对桔梗皂苷及其合成过程中的关键酶基因表达量的影响。植物生长发育需要大量的营养元素,这些元素大部分来自于土壤,

土壤元素能够影响植物体内元素含量,进而影响植物次生代谢产物,Zhu等^[26]研究发现当施P量高于20 kg/(P·ha)桔梗皂苷含量开始降低;刘岩等^[27]研究发现,土壤中的无机元素含量影响黄芩对无机元素的吸收,土壤中的大量元素K,微量元素Fe和Mg能够促进黄芩中黄芩苷的合成,任平等^[28]研究发现土壤元素微量元素Cu、Fe对景天三七活性成分含量影响较大。本研究发现,不同产地桔梗土壤元素含量差异较大,桔梗皂苷D含量最高的河南洛阳(J3)样地的土壤有效微量元素Fe、Cu、Zn和Mn含量处于极高水平,相关性分析发现,土壤中Cu和Ca含量能够分别促进桔梗木质部和韧皮部桔梗总皂苷的合成,土壤中Zn和Ca含量分别促进了桔梗根部桔梗皂苷D和桔梗总皂苷的合成,所以土壤元素中Cu、Zn和Ca的含量是造成不同产地桔梗皂苷含量不同的主要土壤因子。

中药材中的次生代谢产物与其合成过程中的关键酶基因密切相关,赵钰等^[29]研究发现,HMGR、 β -AS、P450-7和P450-12这4个基因柴胡皂苷含量有重要关联;本研究发现桔梗韧皮部的桔梗皂苷D和桔梗总皂苷含量均高于木质部,AACT和IPPI基因在韧皮部的表达量明显高于木质部,这2个基因可能是导致桔梗皂苷在韧皮部和木质部差异较大的关键基因,MVD、IPPI和FPPS基因在桔梗木质部的过量表达抑制了木质部的桔梗总皂苷皂苷的合成,MVD、IPPI和FPPS与桔梗根部的桔梗皂苷D含量呈显著正相关($P<0.05$),在桔梗皂苷D的合成过程中起主要调控作用。

生态因子能够调控关键酶基因表达量进而影响皂苷含量^[30],杨林林等^[31]研究发现,生态因子与关键酶基因的表达共同调控了人参皂苷的合成,对人参皂苷的积累有重要影响;韦赫等^[32]研究发现水分能够通过调控HMGR、FPS、SE和CAS基因影响黄芪皂苷含量;关于土壤中元素对药用植物关键酶基因表达量影响的研究较少,本研究发现桔梗皂苷的形成主要受土壤Cu、Zn和Ca影响最大,土壤中Zn含量与FPPS基因表达量呈显著正相关($P<0.05$),而FPPS基因是桔梗皂苷合成过程中起主要调控作用的关键酶基因之一,表明土壤Zn主要通过调控FPPS基因进而影响桔梗皂苷的合成。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志-第四

十二卷,第一分册[M]. 北京: 科学出版社,1993: 23.

[2] 中国药典[S]. 一部: 2020: 289.

[3] 李喜凤,杜云锋,谢新年,等. 不同产地桔梗药材HPLC指纹图谱及桔梗皂苷D含量测定研究[J]. 中成药,2010,32(4): 529-532.

[4] 曾静凯,郭青. 不同产地桔梗性状、浸出物、桔梗皂苷D含量及HPLC指纹图谱比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(24): 62-70.

[5] 谭玲玲,侯晓敏,胡正海. 不同产地桔梗药材中桔梗总皂苷和桔梗皂苷D的测定[J]. 中草药,2015,46(11): 1682-1684.

[6] 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): 119-124,129.

[7] 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.

[8] 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.

[9] 杨林林. 不同生长时期人参皂苷合成及其关键酶基因表达对生态因子的响应[D]. 长春: 吉林农业大学,2017.

[10] 杨月,陈艳姣,张爱琛,等. 土壤无机元素含量与三七药材品质的关系[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(13): 47-53.

[11] 王升,赵曼茜,郭兰萍,等. 不同产地黄芩中无机元素含量及其与根际土壤无机元素的关系[J]. 生态学报,2014,34(16): 4734-4745.

[12] Ma C H, Gao Z J, Zhang J J, et al. Candidate genes involved in the biosynthesis of triterpenoid saponins in *Platycodon grandiflorum* identified by transcriptome analysis[J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 673.

[13] 许晓双,张福生,秦雪梅. 三萜皂苷生物合成途径及关键酶的研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2014,16(11): 2440-2448.

[14] 杨鹤,宋述尧,许永华,等. 人参三萜皂苷的研究进展及其生态学作用[J]. 中草药,2017,48(8): 1692-1698.

[15] 张萍,刘迪秋,葛锋,等. 三七3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶A还原酶基因的克隆和生物信息学分析[J]. 中草药,2014,45(18): 2684-2690.

[16] Liu W J, Lv H Z, He L, et al. Cloning and bioinformatic analysis of HMGS and HMGR genes from *Panax notoginseng* [J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(4): 344-351.

[17] 朱昀昊,苏秀红,董诚明,等. 冬凌草AACT基因的克隆与表达分析[J]. 中药材,2016,39(1): 37-41.

[18] 陈笛,王鹏杰,郑玉成,等. 茉莉花MVD基因及其启动子的克隆与表达[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版,2019,48(3): 309-315.

- [19] Tong Y R, Zhang M, Su P, *et al.* Cloning and functional characterization of an isopentenyl diphosphate isomerase gene from *Tripterygium wilfordii* [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2016, 63(6): 863-869.
- [20] Berthelot K, Estevez Y, Deffieux A, *et al.* Isopentenyl diphosphate isomerase: A checkpoint to isoprenoid biosynthesis [J]. *Biochimie*, 2012, 94(8): 1621-1634.
- [21] 张瑶瑶, 宋丽, 刘伟, 等. 香樟 FPPS 基因的克隆及生物信息学分析 [J]. *分子植物育种*, 2018, 16(19): 6276-6281.
- [22] 吴沂芸, 罗静, 王黎, 等. 橘核角鲨烯合成酶基因(ss)的克隆、分析及表达 [J]. *中药材*, 2016, 39(2): 270-274.
- [23] Su H L, Liu Y M, Xiao Y L, *et al.* Molecular and biochemical characterization of squalene synthase from *Siraitia grosvenorii* [J]. *Biotechnol Lett*, 2017, 39(7): 1009-1018.
- [24] 鲍士旦. 土壤农化分析 [M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2000: 263.
- [25] 李小莹, 林裕英, 陈丰连. 鸡血藤木质部、韧皮部黄酮类成分比较及药效成分分布规律研究 [J]. *中药材*, 2017, 40(5): 1137-1140.
- [26] Zhu L X, Liu D. Effects of different phosphorus applications on growth and platycodin content of Balloon Flower (*Platycodon grandiflorum*) [J]. *Sci Hortic*, 2014, 178: 8-13.
- [27] 刘岩, 李连泰, 计小清, 等. 土壤中无机元素对不同产地黄芩中无机元素和黄芩苷量的影响 [J]. *中草药*, 2017, 48(6): 1225-1228.
- [28] 任平, 付博, 刘晨, 等. 景天三七主要活性成分与土壤、气象因子的相关性 [J]. *生态环境学报*, 2019, 28(5): 908-917.
- [29] 赵钰, 杨林林, 韩梅, 等. 北柴胡不同部位柴胡皂苷含量与其关键酶基因表达量的相关性研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(10): 2433-2441.
- [30] Cheng L, Han M, Yang L M, *et al.* Changes in the physiological characteristics and baicalin biosynthesis metabolism of *Scutellaria baicalensis* Georgi under drought stress [J]. *Ind Crops Prod*, 2018, 122: 473-482.
- [31] 杨林林, 张涛, 杨利民, 等. 生态因子对人参皂苷合成及其关键酶基因表达的影响 [J]. *中草药*, 2017, 48(20): 4296-4305.
- [32] 韦赫, 程林, 吴培, 等. 黄芪皂苷生物合成对短期水分变化的响应 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(3): 441-447.

[责任编辑 时圣明]