

## • 药材与资源 •

基于权重基因共表达网络分析挖掘人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 生物合成相关基因

刘畅, 刘思章, 于靖辉, 陈屏, 雷军, 王义, 张美萍\*

吉林农业大学生命科学学院, 吉林省人参基因资源开发与利用工程研究中心, 吉林 长春 130118

**摘要:** 目的 通过权重基因共表达网络分析 (weighted gene co-expression network analysis, WGCNA) 挖掘人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 生物合成相关基因。方法 以种植于吉林省人参主产区 304 个农家品种的转录组测序数据为基础, 以人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 含量为表型进行差异表达基因的挖掘。结果 通过 WGCNA 获得 6 个与人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 含量密切相关的基因共表达模块, 根据关联分析结果确定 Green 模块为与人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 含量显著相关的关键模块。功能注释结果显示 Green 模块内的基因富集到 mRNA 结合、蛋白修饰等多个相关途径。通过构建基因互作网络筛选获得 7 个核心基因, 功能预测表明这些基因可能在人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 的生物合成途径中起着重要作用。对 7 个候选基因进行茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 体外调控分析。对人参不定根进行 MeJA 诱导处理, 随 MeJA 的诱导, *comp9517\_c0\_seq1*、*comp10896\_c0\_seq1*、*comp43180\_c0\_seq2*、*comp64014\_c0\_seq8* 的表达量与人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 的含量同时呈现显著变化, 但只有 *comp64014\_c0\_seq8* 的表达趋势与人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 在 MeJA 诱导下的表达趋势相同, 表明这条候选基因可能与人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 的合成密切相关。结论 为人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 生物合成途径的解析提供了理论基础。

**关键词:** 人参; 人参皂苷 Rh<sub>1</sub>; 差异表达基因; 权重基因共表达网络分析; 茉莉酸甲酯

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)08-2723-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.08.021

Mining of genes related to biosynthesis of ginsenoside Rh<sub>1</sub> based on WGCNA in *Panax ginseng*

LIU Chang, LIU Sizhang, YU Jinghui, CHEN Ping, LEI Jun, WANG Yi, ZHANG Meiping

Jilin Province Engineering Research Center of Ginseng Gene Resources Development and Utilization, College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun, 130118, China

**Abstract: Objective** The aim of this study is to unearth genes associated with the biosynthesis of ginsenoside Rh<sub>1</sub> employ through weighted gene co-expression network analysis (WGCNA). **Methods** Utilizing transcriptome sequencing data from 304 distinct domesticated varieties of ginseng cultivated in the primary ginseng-producing region of Jilin Province, China, we conducted a differentially expressed gene mining with ginsenoside Rh<sub>1</sub> content as the phenotypic parameter. **Results** A total of six co-expression modules of genes intimately correlated with ginsenoside Rh<sub>1</sub> content was gained by employing WGCNA. Subsequent correlation analyses highlighted the Green module as a pivotal module significantly associated with ginsenoside Rh<sub>1</sub> content. Functional annotation results revealed that genes within the Green module were enriched in several pathways, including mRNA binding and protein modification. A total of seven core genes were selected by constructing gene interaction network, and functional prediction indicated that these genes may play crucial roles in the biosynthesis pathway of ginsenoside Rh<sub>1</sub>. *In vitro* modulation analysis of methyl jasmonate (MeJA) was performed on these seven candidate genes. Upon MeJA induction in ginseng adventitious roots, the expression levels of *comp9517\_c0\_seq1*, *comp10896\_c0\_seq1*, *comp43180\_c0\_seq2*, and *comp64014\_c0\_seq8* and ginsenoside Rh<sub>1</sub> content exhibited significant simultaneous changes. However, only the expression trend of *comp64014\_c0\_seq8* was the same as that of ginsenoside Rh<sub>1</sub> induced by MeJA, indicating that this candidate gene may be closely related to ginsenoside Rh<sub>1</sub> synthesis. **Conclusion** This study lays the theoretical foundation for unraveling the biosynthesis pathway of ginsenoside Rh<sub>1</sub>.

**Key words:** *Panax ginseng* C. A. Mey.; ginsenosides Rh<sub>1</sub>; differentially expressed gene; WGCNA; methyl jasmonate

收稿日期: 2023-10-05

基金项目: 吉林省科技厅项目 (20180101027JC, 20200403011SF); 国家自然科学基金青年基金项目 (31401445)

作者简介: 刘畅, 硕士研究生, 研究方向为人参基因组学。Tel: 15148182822 E-mail: 2454278361@qq.com

\*通信作者: 张美萍, 博士生导师, 研究方向为人参功能基因组学、人参分子设计育种。Tel: 13504315977 E-mail: meiping.zhang@jlau.edu.cn

人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 是一种药用价值极高的五加科人参属多年生草本植物，广泛应用于中药领域。其根、茎、叶和花等部位都含有丰富的生物活性成分，如人参皂苷、多糖、维生素、氨基酸等。人参皂苷作为最重要的活性成分之一，具有提高免疫力、抗氧化、改善中枢神经系统紊乱等多种药理作用<sup>[1]</sup>。目前已从人参中分离鉴定出多种不同的人参皂苷，如人参皂苷 Rh<sub>1</sub>、Rc、Rd、Rf 等，这些不同种类的人参皂苷具有不同的药理活性和生物利用度。随着生物信息学技术的发展，利用基因组学、转录组学、代谢组学等手段对人参遗传信息进行解析已经成为人参皂苷合成途径研究的重要手段。这些研究不仅揭示了人参皂苷合成途径的分子机制，还为人参的遗传育种提供了重要的理论基础。

人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 是一种四环三萜达玛烷型皂苷单体，按结构分类属于原三醇型人参皂苷，是一种具有广泛药理活性的稀有皂苷<sup>[2-3]</sup>。已有研究表明，人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 可以抑制肿瘤细胞的扩散，对神经系统和免疫系统也有积极的影响，具有改善哮喘<sup>[4]</sup>、抗癌<sup>[5]</sup>、预防肝损伤<sup>[6]</sup>等多种药理作用。人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 的生物合成途径包括 3 个部分：上游人参皂苷母核苷元前体物的合成、中游人参皂苷母核苷元碳骨架延长以及下游母核苷元形成及后修饰。其中，上游人参皂苷母核苷元前体物的合成是人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 合成途径中的关键步骤之一。这些前体物质可以通过甲羟戊酸 (mevalonic acid, MVA) 和甲基赤藓糖醇磷酸化 (methylerythritol phosphate pathway, MEP) 途径合成，其中异戊二烯焦磷酸 (isopentenyl pyrophosphate, IPP) 和二甲基烯丙基焦磷酸 (dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP) 是合成人参皂苷母核苷元骨架的重要前体物。中游人参皂苷母核苷元碳骨架延长是人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 合成途径的第二个关键步骤。IPP 和 DMAPP 在多种萜类合酶的催化下，依次形成牻牛儿基焦磷酸 (geranyl pyrophosphate)、法尼基焦磷酸 (farnesyl pyrophosphate) 和角鲨烯 (squalene)，完成了人参皂苷母核苷元骨架的延长。角鲨烯通过角鲨烯环氧酶形成不同人参皂苷母核苷元的共同前体物质 2,3-氧化角鲨烯，为人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 的合成提供了重要的前体物质。下游母核苷元形成及后修饰是人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 合成途径的最后一个步骤。这一步骤主要包括一系列的细胞色素氧化酶 (P450)、糖基转移酶等酶的修饰。通过这些酶的作用，人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 的结构得到了进一步的修饰和调整，最终形成了人参

皂苷 Rh<sub>1</sub> 单体<sup>[7-9]</sup>。

转录组测序是目前广泛应用于生命科学研究中的一种高通量技术。它可以帮助研究人员准确鉴定和获得性状功能基因。然而，由于基因的表达与性状间存在复杂的关联，因此我们需要发现一种更为精准的方法来挖掘控制目标性状的候选基因<sup>[10-11]</sup>。差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 是指当基因在 RNA 水平处于不同环境、压力、和时间等条件时，表达有显著性差异的基因<sup>[12]</sup>。近年来差异表达基因相关分析在药用植物研究领域广泛应用，对控制相关生物学基因性状的候选基因鉴定以及植物品种选育具有重要意义<sup>[13-17]</sup>。权重基因共表达网络分析 (weighted gene co-expression network analysis, WGCNA) 作为一种新的基因互作网络建模方法，能够将基因分为不同的模块，并与表型相关联，从而挖掘出关键模块中的基因进行深入研究<sup>[18-19]</sup>。WGCNA 已经被广泛应用于药用植物领域<sup>[20-22]</sup>。然而，在人参研究领域，尚未有研究使用 WGCNA 的分析方法挖掘与人参皂苷生物合成相关的基因。人参皂苷是人参中最主要的有效成分之一，对于揭示其生物合成机制具有重要意义。因此，使用 WGCNA 方法，挖掘与人参皂苷合成相关的基因，将有助于深入了解人参皂苷的生物合成机制，提高人参的遗传育种水平。

本研究以吉林省人参主产区 304 个农家品种的转录组测序数据为基础，并挖掘了与人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 差异表达相关的基因，构建了 WGCNA 共表达网络。通过将共表达网络中的基因划分为不同的基因模块，再通过与人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 含量的相关性分析进一步确定关键模块。筛选出人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 的生物合成相关中的核心基因，该核心基因在人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 的生物合成途径中具有重要作用，本研究还对这些核心基因的表达模式进行了分析，为深入了解人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 的生物合成途径提供了参考。同时为实现利用植物细胞工厂定向化生产人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 奠定了基础。为其他药用植物重要性状相关基因挖掘提供参考。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪，美国 Waters 公司；电子分析天平，上海精密科学仪器有限公司；超声清洗机，宁波新芝生物科技有限公司；37 °C 恒温烘箱，Thermo 公司；恒温摇床，上海智诚分析仪器有限公司；超低温冰箱，Thermo 公司；水浴

锅, 上海一恒科技有限公司; 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; 荧光定量 PCR 仪, 赛默飞世尔科技有限公司。

## 1.2 材料

对照品人参皂苷 Rh<sub>1</sub> (批号为 B21061), 质量分数 ≥98%, 上海源叶生物科技有限公司; 甲醇 (批号 M813895) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 色谱甲醇批号为 MS1922-801, 色谱乙腈批号为 AS1122-801, 美国天地有限公司; 屈臣氏蒸馏水, 北京屈臣氏蒸馏水有限公司; 茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 批号为 M46630, 上海吉至生化科技有限公司。

本研究所用 304 份人参材料为吉林省人参基因资源开发与利用工程研究中心提供, 来源于种植在吉林省人参主产区的四年生人参主根, 经吉林农业大学生命科学院王义教授鉴定为五加科人参属植物人参 *P. ginseng* C. A. Meyer; 本研究所用数据库为吉林省人参基因资源开发与利用工程研究中心根据种植于吉林省人参主产区的 304 个农家品种 (S1~S304) 4 年生人参样本根部转录组测序数据所建立的转录组序列及表达量数据库 (NCBI: SRR1313640~SRR132505) [23], 包括 304 个农家品种 4 年生人参样本根部人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 含量。

## 2 方法

### 2.1 人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 生物合成差异基因的挖掘

**2.1.1 样本数据的预处理** 将数据库中的 304 个样本按照人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 含量进行排序, 分别取人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 含量较高的前 25 个样本及人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 含量较低的后 25 个样本, 设置为高含量组及低含量组, 绘制布鲁克斯图, 探讨样本间差异性。使用 Perl 语言分别调取 2 组样本的转录组序列及表达量, 用于差异基因挖掘。

**2.1.2 差异基因的挖掘** 调用 R 语言中的 DESeq2 包对上述高低 2 组样本中的数据样本进行差异基因分析, 将  $P \leq 0.05$  的基因视为差异基因。利用 TBtools 绘制差异基因的火山图及热图, 并通过主成分分析 (principal component analysis, PCA) 进一步分析验证高低两组样本间的差异性。

### 2.2 权重共表达网络的构建

利用权重共表达网络分析基因与人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 含量之间的关系, 以“2.1.2”项中挖掘获得的差异基因为输入数据, 调用 R 语言中的 WGCNA 包构建共表达网络。利用 Pearson 相关矩阵和网络拓扑分

析分别计算基因相关性和软阈值能力。选择合适的软阈值对原始矩阵进行转化, 得到邻接矩阵, 然后将邻接矩阵转化为拓扑重叠矩阵, 并运用动态切割法进行基因聚类及划分模块。设定模块最少基因数为 5, 相似模块合并阈值为 0.85。绘制样本表达模式热图, 并通过模块特征值来展示模块基因在各个样本中的表达模式, 根据模块特征向量基因分析确定与人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 含量显著相关的特异性模块, 选择相应的模块进行深入研究。

### 2.3 关键模块的功能富集分析

为进一步分析关键模块的功能, 使用 Blast2GO 及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 在线平台对关键模块内的基因进行基因本体论 (GeneOntology, GO) 功能注释及 KEGG 通路分析。经过多重检验校正后, 以  $P \leq 0.05$  为阈值, 满足此条件的定义为显著富集的 GO 条目及 KEGG 通路。

### 2.4 基因互作网络构建及核心基因的挖掘

为获得关键模块中的核心基因, 为获得关键模块中的核心基因, 利用 Cytoscape3.9.0 软件中的 cytoHubba 插件, 选择 MCC 算法, 对关键模块内的基因进行可视化处理, 每个节点代表 1 个基因, 连线代表基因间的关系。根据互作网络快速筛选出 Weight 值及模块连通性都较高的基因, 作为关键模块核心基因。利用 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取这些核心基因的相关信息, 并在韩国人参基因组 [24] 中查找其同源基因的注释结果, 进一步预测其功能。

### 2.5 MeJA 诱导人参皂苷 Rh<sub>1</sub>

将 2 g 在固体 B5 培养基上生长的人参不定根接种于液体 B5 培养基中, 在 22 °C、110 r/min 的摇床中黑暗培养 23 d, 在对数生长期后, 向培养基中添加 200 μmol/L MeJA 进行诱导处理, 诱导时间设置为 6、12、24、36、48、60、72、84、96、108、120 h, 在每个时间点收获材料, 同时以 MeJA 处理 0 h 的材料作为对照组收获, 对上述每组材料进行 3 次生物学重复。取样时, 将 0.5 g 新鲜样品进行液氮速冻, 保存在 -80 °C 冰箱中, 将剩余样品在 37 °C 恒温烘箱烘干至恒定质量后提取人参皂苷。利用索氏提取法进行皂苷提取。

### 2.6 人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 的测定

**2.6.1 对照品溶液的制备** 分别称取人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 对照品适量, 加入甲醇定容, 经 0.22 μm 膜滤过,

制成含人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 质量浓度为 0.075 mg/mL 的对照品溶液。

**2.6.2 供试品溶液的制备** 取“2.5”项所述方法的人参皂苷提取液，用 0.22 μm 有机滤膜滤过，得供试品溶液。

**2.6.3 色谱条件**<sup>[25]</sup> 高效液相色谱系统是 Waterse2695，色谱柱为 Waters C<sub>18</sub> 柱。流动相组为屈臣氏蒸馏水 (A) 和色谱乙腈 (B)，梯度洗脱，进样量为 10 μL，柱温 30 °C，流动相体积流量为 1.0 mL/min。检测波长为 203 nm。梯度洗脱：0~40 min，18%~21% B；40~42 min，21%~26% B；42~46 min，26%~32% B；46~66 min，32%~33.5% B；66~71 min，33.5%~38% B；71~86 min，38%~65% B；86~91 min，65% B；91~96 min，65%~85% B；96~103 min，85% B；103~105 min，85%~18% B；105~120 min，82% B。

**2.6.4 线性关系考察** 精密吸取上述混合对照品溶液，按照“2.6.3”项色谱条件进行测定，以色谱峰面积为纵坐标 (Y)，以人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 对照品质量浓度为横坐标 (X)，绘制标准曲线，进行线性回归，得到回归方程，相关系数 (R<sup>2</sup>) 和线性范围分别为人参皂苷 Rh<sub>1</sub>  $Y=347\ 766.69X-6\ 332.14$ ，R<sup>2</sup>=0.999 65，线性范围 6.0~0.375 μg/mL。

**2.6.5 稳定性试验** 精密吸取适量的人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 10 μL 对照品溶液，依照“2.6.3”项色谱条件分别在 0、4、8、12、16、20、24 h 进样，测得人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 的峰面积的 RSD 为 0.80%，表明仪器稳定性良好。

**2.6.6 精密度试验** 精密吸取适量的人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 10 μL 对照品溶液，按照“2.6.3”项色谱条件进行分析，连续进样 6 次，测得人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 的峰面积的 RSD 为 0.89%，表明仪器精密度良好。

**2.6.7 重复性试验** 精密吸取人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 对照品溶液 6 份，按照按照“2.6.3”项色谱条件进行分析，测定人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 的峰面积，通过线性回归方程计算其质量分数 RSD 值为 0.96%，结果表明该方法重复性较好。

**2.6.8 加样回收率的测定** 精密吸取已知质量分数的人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 对照品溶液，按照“2.6.2”项和“2.6.3”项方法制备供试液和进样，计算得到人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 的加样回收率为 99.63%，RSD 值为 1.14%，数据表明测试结果的准确度良好。

**2.6.9 人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 的测定** 根据“2.6.3”项色谱

条件对 MeJA 处理的人参不定根中的人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 进行含量测定。

## 2.7 RNA 提取、cDNA 文库构建及数据组装

使用 Trizol 试剂盒提取人参不定根的总 RNA，按照 Jiang 等<sup>[26]</sup>的方法构建 RNA-seq 文库。文库经过鉴定、定量和复用，使用 HiSeq X Ten (Illumina, Inc., San Diego, 美国) 进行测序，使用 Trinity (Version 2.14.0) 软件，以人参 unigene 的转录组为参考，从过滤后的读数中组装单个基因转录本。使用 RSEM (Version 1.3.3) 软件对单个转录本的表达量和基因的整体表达量进行了量化。转录本的表达量以每百万转录本 (TPM) 为单位，用于进一步分析。PgRh<sub>1</sub> 候选基因转录本的表达量是从每个时间点取样的不定根的每个生物重复中提取的。

## 2.8 人参皂苷合成候选基因在 MeJA 诱导下的功能验证

为了验证 MeJA 处理对人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 生物合成的影响，通过 *t* 检验，将 6~120 h 每个时间点的 3 个生物重复的人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 含量与 0 h 时间点的人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 含量进行比较。使用 TRIpure Reagent Total RNA Extraction Reagent 从每个时间点采样的 3 个生物重复中分离出总 RNAs。PgRh<sub>1</sub> 候选基因转录本的表达量是从每个时间点取样的不定根的每个生物重复中提取的。通过 *t* 检验，比较每个时间点 MeJA 处理的样本和 0 h 时间点对照样本的基因表达，确认 MeJA 处理对 PgRh<sub>1</sub> 候选基因表达的影响。为了进一步确认 PgRh<sub>1</sub> 候选基因在人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 生物合成中的作用，分析其单个转录本的表达，并对每个时间点 (包括 0 h) 的单个转录本的表达与每个时间点的人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 含量进行了 Pearson 相关分析。如果一个 PgRh<sub>1</sub> 候选基因的转录本表达量与人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 含量在  $P \leq 0.05$  的双尾显著性水平下有相关性，则认为拼接到该转录本的基因参与人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 的生物合成。

## 3 结果与分析

### 3.1 人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 生物合成差异基因的挖掘

**3.1.1 样本数据的预处理** 首先对 304 个农家品种 4 年生根的人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 含量分布情况进行了统计。如图 1 所示，304 个农家品种 4 年生根中人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 皂苷含量呈正态分布，存在较大差异。将 304 个农家品种 4 年生根中的人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 含量进行分组，每组 25 个农家品种，含量高的为高组，含量低的为低组。图 2 显示了这 2 组人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 皂苷含量显著不同 ( $P \leq 0.05$ )，可用于进一步进行差异表达基因分析。

**3.1.2 差异基因的挖掘** 将“3.1.1”项得到的差异基因进行了火山图(图3)和热图的绘制(图4)。在703个差异基因中,有578个基因上调,而125个基因下调。对这些差异基因进一步进行了PCA分析。PCA结果(图5)表明高低含量2组之间存在明显差异,这为进一步的分析提供了基础。

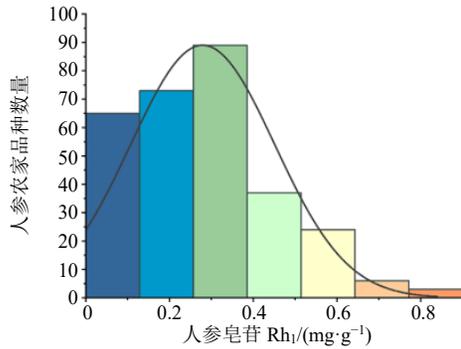


图1 304份样本人参皂苷Rh<sub>1</sub>含量的频率分布直方图  
Fig. 1 Histogram of frequency distribution of ginsenoside Rh<sub>1</sub> content in 304 samples

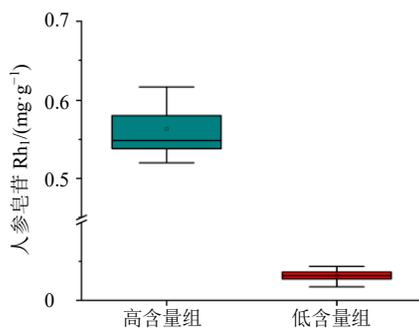


图2 人参皂苷Rh<sub>1</sub>含量差异分组  
Fig. 2 Grouping of differences in ginsenoside Rh<sub>1</sub> content

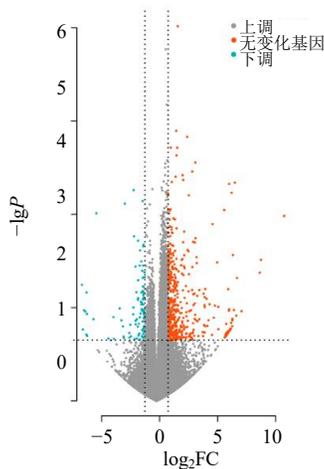


图3 人参皂苷Rh<sub>1</sub>差异基因火山图  
Fig. 3 Ginsenoside Rh<sub>1</sub> differential gene volcano map

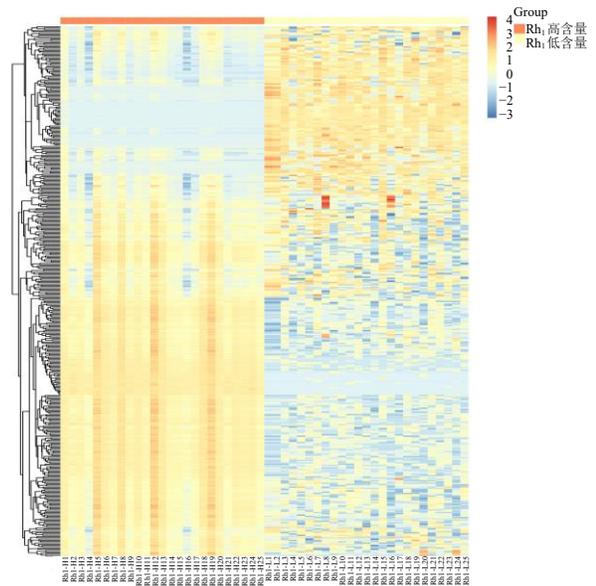


图4 人参皂苷Rh<sub>1</sub>差异基因表达量热图  
Fig. 4 Heat map of differential gene expression of ginsenoside Rh<sub>1</sub>

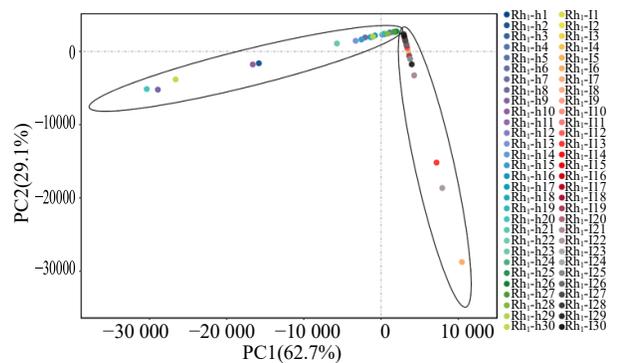


图5 人参皂苷Rh<sub>1</sub>差异基因PCA分析  
Fig. 5 Principal component analysis of ginsenoside Rh<sub>1</sub> differential gene

**3.1.3 差异基因的功能富集分析** 对“3.1.2”项获得的差异基因进行了GO功能注释和KEGG信号通路分析。进一步总结了差异基因的GO功能注释和KEGG信号通路分析结果。根据GO功能注释的结果(图6),发现核心模块基因的功能主要涉及核酸结合(GO: 0003676)、RNA结合(GO: 0003723)、mRNA结合(GO: 0003729)、细胞液(GO: 0005829)、核质(GO: 0005654)、染色质组织(GO: 0006325)、细胞蛋白修饰过程(GO: 0006464)、质体(GO: 0009536)、转移酶活性(GO: 0016740)、蛋白修饰过程(GO: 0036211)和催化活性(GO: 0140096)等多个GO term。KEGG富集结果显示(图7),差异基因的代谢通路主要集中在碳水化合物代谢、转运、信号转导、运输和分解代谢等途径。

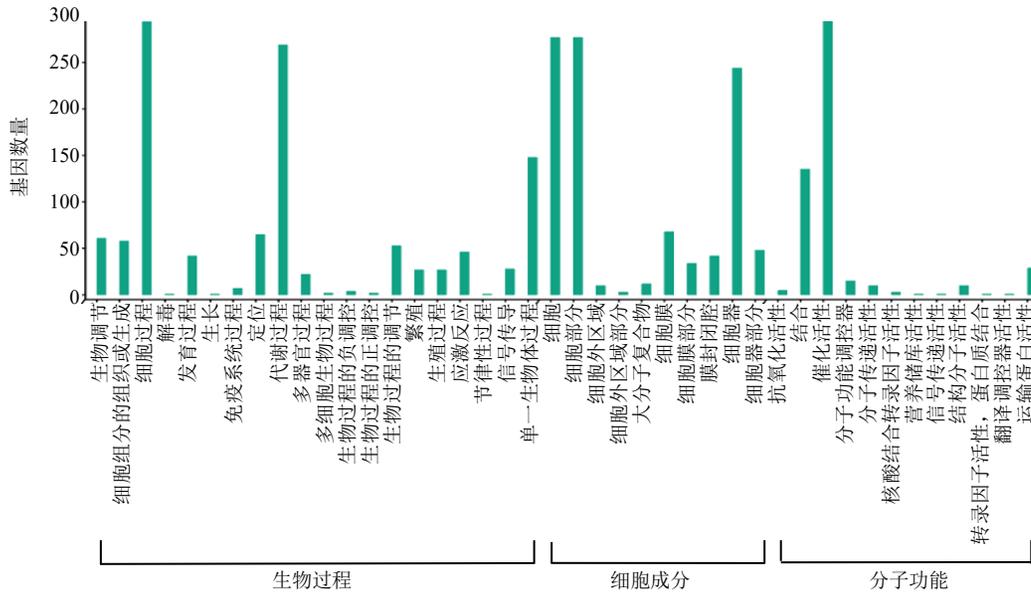


图 6 核心模块的 GO 富集分析 Fig. 6 GO enrichment analysis of core modules

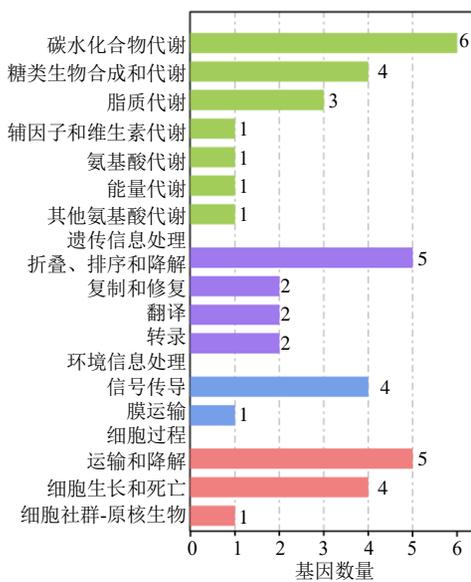


图 7 核心模块 KEGG 富集功能分析 Fig. 7 KEGG enrichment functional analysis of core modules

### 3.2 权重共表达网络的构建

**3.2.1 软阈值的确定** 根据加权共表达网络的要求，利用无尺度拓扑结构准则来确定软阈值  $\beta$ 。运用 R 语言中 WGCNA 包中的 pickSoftThreshold 函数计算软阈值。数值范围设置为 1~20，计算相关系数的平方和基因的平均连接度，以确定最佳的软阈值。根据本研究的选择标准，选择拟合曲线第一次超过 0.85 时的 power 值来筛选共表达模块，当 power=12 时，无标度拓扑拟合指数曲线在达到较高值后开始变平（图 8）。因此，选择 12 作为后续

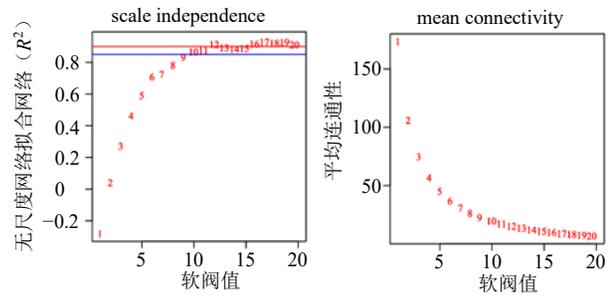


图 8 软阈值的确定与平均连通度图 Fig. 8 Determination of Soft Threshold with average connectivity map

分析的 power 值。

**3.2.2 构建加权共表达网络和基因模块的确定** 在网络构建和模块划分的过程中，选择了  $\beta$  值为 12 为最佳软阈值，并根据基因拓扑重叠矩阵的相异度进行聚类。通过聚类分析，得到了基因拓扑重叠聚类树和相关性热图。根据图 9 的结果，将与人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 相关的 703 个差异基因分为了 6 个模块。在这 6 个模块中，turquoise 模块拥有最多的基因数量，共有 333 条基因，而 red 模块则只包含 6 条基因，是基因数量最少的模块。一般 WGCNA 中 grey 模块被视为不能分配给任何其他模块的基因集合。

**3.2.3 模块与人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 的相关性系数计算及关键模块确定** 通过计算基因模块与人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 的相关性系数，确定了关键模块。根据图 10 的相关性热图，发现在 6 个基因模块中，有 4 个基因模块与人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 呈现正相关，而另外 2 个基因模块与

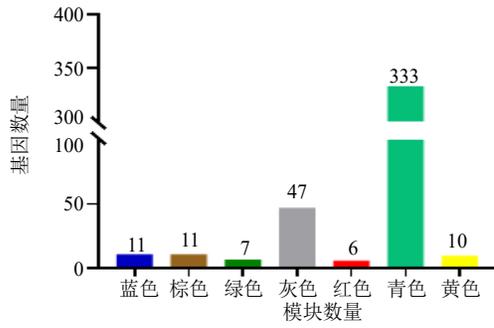


图 9 6 个基因模块中基因数量分布  
Fig. 9 Gene quantity distribution in six gene modules

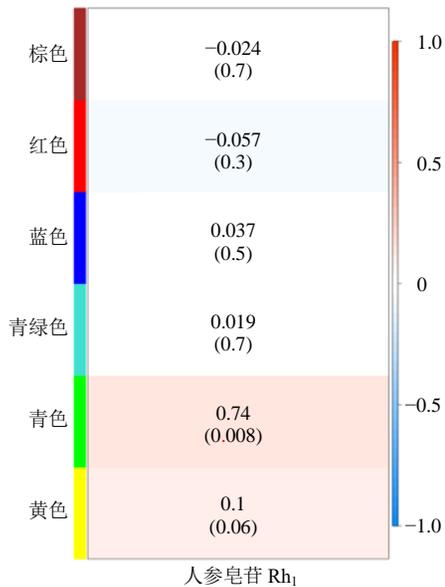


图 10 6 个基因模块与人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 含量关联热图  
Fig. 10 Heat map of association between six gene modules and ginsenoside Rh<sub>1</sub> content

人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 呈现负相关。在这些基因模块中，Green 模块的相关系数达到了 0.74，P 值为 0.008。因此，选择 Green 模块中的基因进行研究。

3.2.4 基因互作网络与核心基因挖掘 可视化得到的核心基因进一步在 NCBI 数据库与韩国基因组数据库进行比对 (表 1)。用 Cytoscape 软件对基因互作网络进行可视化，根据 weight 值与基因之间的连通性建立基因互作网络 (图 11)。

### 3.3 MeJA 诱导处理后人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 含量变化

本实验在 MeJA 诱导处理后的不同时间内，通过高效液相色谱检测人参不定根中人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 皂苷含量。根据图 12 结果，与对照组 (0 h) 相比，MeJA 处理 48 h 后人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 含量显著变化，表明人参不定根中的人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 对 MeJA 有响应作用。MeJA 显著促进了人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 的生物合成，随着 MeJA 处理时间的增加，人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 含量显著增加。在处理 84 h 时，人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 含量达到最高值 1.09 mg/g，相较于对照组，人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 含量增加了 3.19 倍，说明 MeJA 对人参不定根中人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 的合成起到了促进作用。

在 MeJA 处理的不同时间点 (48、72、84、96、108、120 h) 下，人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 的含量与对照组相比均发生了变化。人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 在 MeJA 处理下的 48 h 时与对照组相比发生显著差异，在 84 h 时人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 含量达到顶峰。由图 13 可知，在 MeJA 处理 72 h 时，人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 候选基因 *comp9517\_c0\_seq1*、*comp10896\_c0\_seq1* 和 *comp43180\_c0\_seq2* 的表达量与对照组也发生了显著变化。同样地，在 MeJA 处理 108 h 时，人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 候选基因 *comp64014\_c0\_seq8* 的表达量与对照组也发生了显著变化。但是在 MeJA 处理 48 h 和 84 h 时，*comp9517\_c0\_seq1*、*comp10896\_c0\_seq1* 和 *comp43180\_c0\_seq2* 的表达情况与人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 含量没有相同的趋势，以上结果说明只有候选基因 *comp64014\_c0\_seq8* 在人参皂苷 Rh<sub>1</sub>

表 1 Green 模块中核心基因的功能注释

Table 1 Functional annotation of core genes in Green module

核心基因编号	功能预测	人参基因组同源性较高基因编号
<i>comp9517_c0_seq1</i>	细胞色素 P450 CYP72A219	<i>Pg_S0960.8</i>
<i>comp10896_c0_seq1</i>	转录因子 ILR3	<i>Pg_S5400.1</i>
<i>comp43180_c0_seq1</i>	四旋蛋白	<i>Pg_S5569.6</i>
<i>comp43180_c0_seq2</i>	生长素响应因子 3	<i>Pg_S2223.12</i>
<i>comp64014_c0_seq8</i>	细胞色素 P450 CYP736A12	<i>Pg_S0252.7</i>
<i>comp65798_c0_seq4</i>	E3 泛素蛋白连接酶 SP1	<i>Pg_S1511.3</i>
<i>comp547972_c0_seq1</i>	含 ATPase 家族结构域的蛋白质 5	<i>Pg_S2396.21</i>

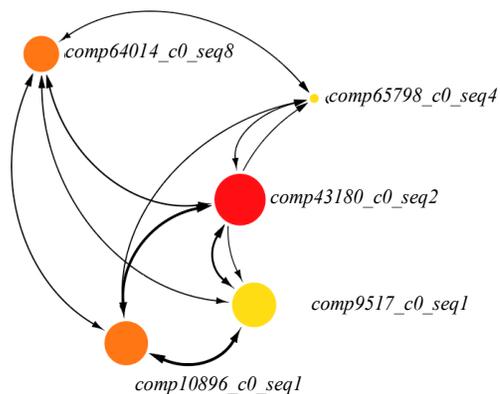
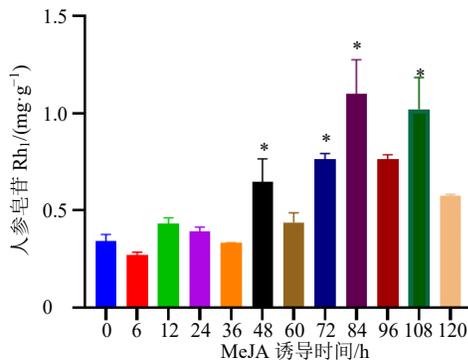


图 11 核心模块中核心基因互作网络分析

Fig. 11 Analysis of core gene interaction network in core modules



与对照组 (0 h) 比较: \* $P < 0.05$   
\* $P < 0.05$  vs control group

图 12 人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 在 MeJA 处理下的表达分析

Fig. 12 Expression analysis of ginsenoside Rh<sub>1</sub> under MeJA treatment

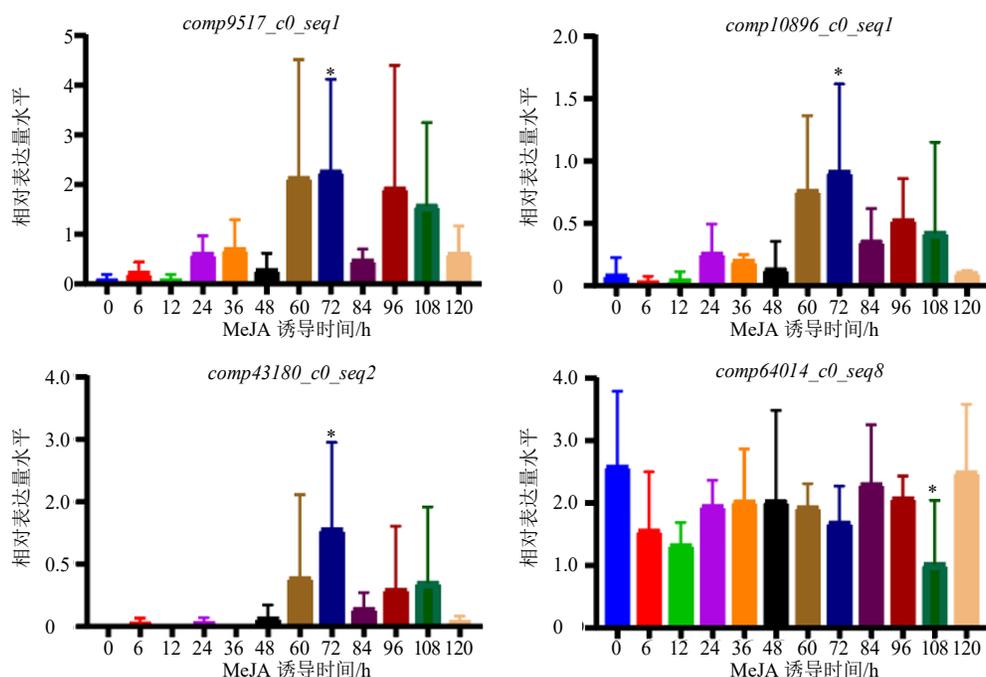


图 13 人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 合成候选基因在 MeJA 处理下的表达分析

Fig. 13 Expression analysis of ginsenoside Rh<sub>1</sub> synthesis candidate genes under MeJA treatment

合成过程中可能发挥重要作用。

#### 4 讨论

由于生物系统的复杂性,许多关键基因在植物次级代谢物的生成过程中尚未明确,这些基因广泛分布在植物染色体中,因此挖掘与表征它们具有一定的挑战性。人参中的主要活性成分,人参皂苷的合成路径及其机制,一直是人参研究的关键话题。

目前已经对 *NAC* 基因家族<sup>[27]</sup>、*AP2/ERH1* 基因家族<sup>[28]</sup>、*bHLH* 基因家族<sup>[29]</sup>、*bZIP* 基因家族<sup>[30]</sup>、*P<sub>450</sub>* 基因家族<sup>[31]</sup>以及 *GRAS* 基因家族<sup>[32]</sup>等在人参皂苷生物合成过程中起作用的多个基因家族进行了全面的

分析和研究,这极大地加强了对人参皂苷合成机制的理解,并为其提供了宝贵的基因资源。

随着高通量测序技术的不断突破与创新和成本的不断降低,多样本的转录组测序在系统研究生命科学问题中已被广泛应用。然而,如何从这些庞大数据中挖掘具有生物学意义的信息已成为转录组分析的核心问题<sup>[33-34]</sup>。在这种背景下,涌现出了大量的生物信息分析工具和方法。WGCNA 作为一种系统生物学方法,可以阐述基因在不同样本间关联模式。WGCNA 将大量的基因分组为若干模块,这些模块内的基因表达模式具有相同的表达模式。通过

与目标性状进行相关性分析确定关键模块,并根据连通性筛选模块内的核心基因,以此可以快速定位与目标表型显著关联的基因。对共表达基因模块的鉴定、与表型性状的关联以及关键枢纽基因的定位具有重要意义<sup>[35]</sup>。

Yao 等<sup>[36]</sup>对重组自交系的 WDD01514 (E1)、ZYD00463 (E2) 及其重组自交系的后代(E23 和 E171)在大豆发育的 2 个关键时期进行 RNA-seq、WGCNA 等分析鉴定出 6 个与种子含油量和种子重量相关的模块后,并结合后续生物信息学分析、q-PCR 等验证 6 个可能参与种子形成和含油量积累的关键基因,为提高大豆的产量和种子油量提供理论支持。Zhu 等<sup>[37]</sup>利用 RNA-seq 和差异基因分析,在水稻转录组的 28 432 个表达基因中鉴定出 457 个响应盐胁迫的核心基因,进一步利用 WGCNA 分析、GO 功能注释、KEGG 分析以及 qRT-PCR 鉴定得到编码 *CAM*、*DUF630/632*、*DUF581*、*CHL27*、*PP2-13*、*LEA4-5* 和转录因子等不同家族蛋白的重要枢纽基因,推动了培养水稻耐盐新品种的研究。Li 等<sup>[38]</sup>对 C2P5A 和 C2P5B 2 种不同的棉花品种在发育的 3 个不同阶段(花粉母细胞、四分体和单核阶段)进行 RNA-seq、WGCNA 分析、差异基因分析等,挖掘得到 3 个与细胞质雄性不育(CMS)高度相关的模块和 7 个与生长发育相关的基因,为棉花育种和生产提供依据。

次生代谢物的生物合成与调控构建了一个多层次的网络,这需要多种关键诱导子(如 MeJA 和水杨酸)和信号通道的合作。已有证据确认,MeJA 是一种强大的诱导子,能够在多种药用植物中刺激高价值药用次生代谢物的生产<sup>[39]</sup>。对于人参培养细胞和人参不定根,MeJA 发挥了显著作用,增加了人参皂苷含量,并且能够上调相关的代谢酶基因表达<sup>[40-41]</sup>。Kim 等<sup>[42]</sup>发现,MeJA 能诱发 *SS*、*SE* 等基因的表达,同时也刺激了皂苷的积累。因此,在本研究中选择使用 MeJA 诱导处理人参不定根,并进行了深入分析。

目前,人参皂苷生物合成关键酶基因,如 *PgSS*<sup>[43-45]</sup>、*PgFPS*<sup>[46]</sup>、*PgDDS*<sup>[47]</sup>、*PgUGT*<sup>[48-50]</sup>、*PgCYP450*<sup>[51]</sup>,均响应 MeJA 调控,皂苷含量和基因表达量都发生了变化,以此证明这些基因参与人参皂苷的生物合成。

本研究结果显示,可能的人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 皂苷候选基因 *comp9517\_c0\_seq1*、*comp10896\_c0\_seq1*、

*comp43180\_c0\_seq2*、*comp64014\_c0\_seq8* 在 MeJA 诱导下表达量均发生显著变化,但只有 *comp64014\_c0\_seq8* 的表达趋势与人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 在 MeJA 诱导下的表达趋势相同,表明这条候选基因可能与人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 的合成密切相关。

总的来说,通过 WGCNA 分析方法,挖掘出了与人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 含量高度相关的关键基因模块,成功地鉴定了与人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 生物合成途径相关的关键候选基因。这些结果为进一步研究人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 的生物合成机制提供了重要的线索,也为人参的遗传改良和代谢工程提供了可能的目标。

通过对 304 个人参样本中人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 含量进行分组,利用差异基因分析的方法成功获得 703 个差异基因。基于 304 份材料中 703 个差异基因的表达量与人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 的含量,通过 WGCNA 分析共获得 6 个基因表达模块。通过模块与表型的关联分析结果显示 Green 模块与人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 含量的关联性最高。对 Green 模块进行 GO 富集分析和 KEGG 富集分析结果显示 Green 模块中的基因可以富集到细胞代谢、RNA 结合和细胞质修饰等 GO term;同时参与碳水化合物代谢、转运、信号转导、运输和分解代谢等途径。因此,Green 模块中的基因参与植物代谢产物的合成。通过 Cytoscape 软件对 Green 模块内的基因进行了可视化处理,并筛选出了 7 个核心基因。通过查询韩国人参基因组注释。结果显示 7 条核心基因注释到了人参皂苷合成 *CYP450* 基因和生长素响应因子等生物功能。

采用 MeJA 诱导处理人参不定根后,发现 *comp9517\_c0\_seq1*、*comp10896\_c0\_seq1*、*comp43180\_c0\_seq2*、*comp64014\_c0\_seq8* 4 条合成候选基因的表达量变化趋势只有 *comp64014\_c0\_seq8* 与人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 在 MeJA 诱导处理下的表达量变化趋势相同,因此 *comp64014\_c0\_seq8* 这条基因可能在人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 皂苷合成过程中发挥重要作用。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Ratan Z A, Haidere M F, Hong Y H, *et al.* Pharmacological potential of ginseng and its major component ginsenosides [J]. *J Ginseng Res*, 2021, 45(2): 199-210.
- [2] 孙小单, 王天鸣, 李慧, 等. 人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 抑制人非小细胞肺癌细胞增殖的机制研究 [J]. *中草药*, 2022,

- 53(2): 441-448.
- [3] 毕云枫, 姜珊, 郑明珠, 等. 稀有原人参三醇型皂苷的生物转化研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(19): 4120-4125.
- [4] Jin Y J, Tangchang W, Kwon O S, *et al.* Ginsenoside Rb<sub>1</sub> ameliorates the asthma and allergic inflammation via inhibiting Akt, MAPK, and NF- $\kappa$ B signaling pathways *in vitro* and *in vivo* [J]. *Life Sci*, 2023, 321: 121607.
- [5] Yoon J H, Choi Y J, Lee S G. Ginsenoside Rb<sub>1</sub> suppresses matrix metalloproteinase-1 expression through inhibition of activator protein-1 and mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 679(1/2/3): 24-33.
- [6] Su W Y, Fan M L, Li Y, *et al.* 20(S)-ginsenoside Rb<sub>1</sub> alleviates T2DM induced liver injury via the Akt/FOXO1 pathway [J]. *Chin J Nat Med*, 2022, 20(9): 669-678.
- [7] Yang J L, Hu Z F, Zhang T T, *et al.* Progress on the studies of the key enzymes of ginsenoside biosynthesis [J]. *Molecules*, 2018, 23(3): 589.
- [8] Hou M Q, Wang R F, Zhao S J, *et al.* Ginsenosides in *Panax* genus and their biosynthesis [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(7): 1813-1834.
- [9] Yin J X, Zhang D H, Zhuang J J, *et al.* Study on the correlation between gene expression and enzyme activity of seven key enzymes and ginsenoside content in ginseng in over time in Ji'an, China [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(12): 2682.
- [10] Velculescu V E, Zhang L, Zhou W, *et al.* Characterization of the yeast transcriptome [J]. *Cell*, 1997, 88(2): 243-251.
- [11] 李欣, 李小俊, 陈晓丽, 等. 转录组数据分析与功能基因挖掘 [J]. 畜牧兽医学报, 2019, 50(3): 474-484.
- [12] 章鲁瑶, 张洋, 张书筠, 等. 类风湿关节炎免疫相关差异表达基因分析 [J]. 牡丹江医学院学报, 2023, 44(1): 44-50.
- [13] Chaudhary S, Sharma P C. DeepSAGE based differential gene expression analysis under cold and freeze stress in seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0121982.
- [14] 吴萍, 王晓宇, 李青苗, 等. 基于高通量转录组测序的白芷差异表达基因分析 [J]. 西南农业学报, 2020, 33(2): 233-240.
- [15] 肖丽君, 陈谦明, 吴玉琪, 等. 基于转录组测序分析芍药苷诱导下口腔黏膜上皮细胞差异表达基因 [J]. 口腔医学研究, 2023, 39(6): 527-533.
- [16] Chang Y J, Wang M Z, Li J, *et al.* Transcriptomic analysis reveals potential genes involved in tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 14929.
- [17] Lei H Y, Niu T Z, Song H F, *et al.* Comparative transcriptome profiling reveals differentially expressed genes involved in flavonoid biosynthesis between biennial and triennial *Sophora flavescens* [J]. *Ind Crops Prod*, 2021, 161: 113217.
- [18] Langfelder P, Horvath S. WGCNA: An R package for weighted correlation network analysis [J]. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9: 559.
- [19] Liu W, Li L, Ye H, *et al.* Weighted gene co-expression network analysis in biomedicine research [J]. *Chin J Biotechnol*, 2017, 33(11): 1791-1801.
- [20] Liu D F, Wang Z J, Zhong L, *et al.* Targets and potential mechanism of *Scutellaria baicalensis* in treatment of primary hepatocellular carcinoma based on bioinformatics analysis [J]. *J Oncol*, 2022, 2022: 8762717.
- [21] Zeng G P, Li Z, Zhao Z. Analysis of weighted gene co-expression network of triterpenoid-related transcriptome characteristics from different strains of *Wolfiporia cocos* [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 18207.
- [22] 鄢东东, 杨启帆, 方柔柔, 等. 基于网络药理学联合加权基因共表达网络分析黄精治疗代谢性相关脂肪性肝病的作用机制 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38(7): 1606-1614.
- [23] Liu S Z, Jiang Y, Wang Y F, *et al.* Genetic and molecular dissection of ginseng (*Panax ginseng* Mey.) germplasm using high-density genic SNP markers, secondary metabolites, and gene expressions [J]. *Front Plant Sci*, 2023, 14: 1165349.
- [24] Kim N H, Jayakodi M, Lee S C, *et al.* Genome and evolution of the shade-requiring medicinal herb *Panax ginseng* [J]. *Plant Biotechnol J*, 2018, 16(11): 1904-1917.
- [25] 于靖辉. 人参内生菌广泛靶向代谢组学分析及其对人参不定根的影响 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2023.
- [26] Jiang Y, Liu S Z, Li L, *et al.* Transcriptome and phenotype integrated analysis identifies genes controlling ginsenoside Rb<sub>1</sub> biosynthesis and reveals their interactions in the process in *Panax ginseng* [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(22): 14016.
- [27] Liu Q, Sun C Y, Han J Z, *et al.* Identification, characterization and functional differentiation of the *NAC* gene family and its roles in response to cold stress in ginseng, *Panax ginseng* C.A. Meyer [J]. *PLoS One*, 2020, 15(6): e0234423.
- [28] Chen J, Zhou Y H, Zhang Q, *et al.* Structural variation, functional differentiation and expression characteristics of the *AP2/ERF* gene family and its response to cold stress and methyl jasmonate in *Panax ginseng* C.A. Meyer [J]. *PLoS One*, 2020, 15(3): e0226055.

- [29] Zhu L, Zhao M Z, Chen M Y, *et al.* The *bHLH* gene family and its response to saline stress in Jilin ginseng, *Panax ginseng* C.A. Meyer [J]. *Mol Genet Genomics*, 2020, 295(4): 877-890.
- [30] Li H J, Chen J, Zhao Q, *et al.* Basic leucine zipper (*bZIP*) transcription factor genes and their responses to drought stress in ginseng, *Panax ginseng* C.A. Meyer [J]. *BMC Genomics*, 2021, 22(1): 316.
- [31] Wang Y, Li X Y, Lin Y P, *et al.* Structural variation, functional differentiation, and activity correlation of the cytochrome P450 gene superfamily revealed in ginseng [J]. *Plant Genome*, 11: 170106.
- [32] Wang N, Wang K Y, Li S K, *et al.* Transcriptome-wide identification, evolutionary analysis, and GA stress response of the *GRAS* gene family in *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. *Plants*, 2020, 9(2): 190.
- [33] Tian J D, Ma K S, Saaem I. Advancing high-throughput gene synthesis technology [J]. *Mol Biosyst*, 2009, 5(7): 714-722.
- [34] 王艳花, 刘景森, 李加纳. 整合 GWAS 和 WGCNA 筛选鉴定甘蓝型油菜生物产量候选基因 [J]. 作物学报, 2021, 47(8): 1491-1510.
- [35] 龙佳丽, 邹奕, 邳植, 等. 转录组测序揭示激素介导的信号通路参与甜菜低温应答 [J]. 中国农学通报, 2021, 37(31): 5-14.
- [36] Yao Y J, Xiong E H, Qu X L, *et al.* WGCNA and transcriptome profiling reveal hub genes for key development stage seed size/oil content between wild and cultivated soybean [J]. *BMC Genomics*, 2023, 24(1): 494.
- [37] Zhu M D, Xie H J, Wei X J, *et al.* WGCNA analysis of salt-responsive core transcriptome identifies novel hub genes in rice [J]. *Genes*, 2019, 10(9): 719.
- [38] Li Y Q, Qin T F, Wei C Y, *et al.* Using transcriptome analysis to screen for key genes and pathways related to cytoplasmic male sterility in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(20): 5120.
- [39] Ho T T, Murthy H N, Park S Y. Methyl jasmonate induced oxidative stress and accumulation of secondary metabolites in plant cell and organ cultures [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 716.
- [40] Lu J, Li J X, Wang S H, *et al.* Advances in ginsenoside biosynthesis and metabolic regulation [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2018, 65(4): 514-522.
- [41] Cao H Z, Nuruzzaman M, Xiu H, *et al.* Transcriptome analysis of methyl jasmonate-elicited *Panax ginseng* adventitious roots to discover putative ginsenoside biosynthesis and transport genes [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(2): 3035-3057.
- [42] 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 Tissue Organ Cult PCTOC*, 2009, 98(1): 25-33.
- [43] Kim Y J, Zhang D B, Yang D C. Biosynthesis and biotechnological production of ginsenosides [J]. *Biotechnol Adv*, 2015, 33(6 Pt 1): 717-735.
- [44] Lee M H, Jeong J H, Seo J W, *et al.* Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* overexpressing squalene synthase gene [J]. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45(8): 976-984.
- [45] 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.
- [46] Kim Y K, Kim Y B, Uddin M R, *et al.* Enhanced triterpene accumulation in *Panax ginseng* hairy roots overexpressing mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase and farnesyl pyrophosphate synthase [J]. *ACS Synth Biol*, 2014, 3(10): 773-779.
- [47] Han J Y, Kwon Y S, Yang D C, *et al.* Expression and RNA interference-induced silencing of the dammarediol synthase gene in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2006, 47(12): 1653-1662.
- [48] Chen S, Luo H, Li Y, *et al.* 454 EST analysis detects genes putatively involved in ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Rep*, 2011, 30(9): 1593-1601.
- [49] Yan X, Fan Y, Wei W, *et al.* Production of bioactive ginsenoside compound K in metabolically engineered yeast [J]. *Cell Res*, 2014, 24(6): 770-773.
- [50] Wang P P, Wei Y J, Fan Y, *et al.* Production of bioactive ginsenosides Rh<sub>2</sub> and Rg<sub>3</sub> by metabolically engineered yeasts [J]. *Metab Eng*, 2015, 29: 97-105.
- [51] Han J Y, Hwang H S, Choi S W, *et al.* Cytochrome P450 CYP716A53v2 catalyzes the formation of protopanaxatriol from protopanaxadiol during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53(9): 1535-1545.

[责任编辑 时圣明]