

## 人参生长素极性运输基因 *PIN* 的表达谱研究

刘娟<sup>1</sup>, 陈同<sup>1</sup>, 袁媛<sup>1\*</sup>, 纪瑞锋<sup>1</sup>, 郭娟<sup>1</sup>, 王英平<sup>2</sup>, 王国良<sup>3</sup>, 黄璐琦<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院中药资源中心, 北京 100700; 2. 中国农业科学院特产研究所, 吉林 长春 130112;  
3. 中国科学院北京基因组研究所, 北京 100101)

**摘要:** 生长素极性运输基因 *PIN* (PIN-FORMED) 决定了植物中生长素浓度梯度分布, 参与多种发育及次生代谢过程。本研究采用转录组热图聚类方法分析了 4 年生吉林人参 14 个不同部位 *PIN2*、*PIN3* 及 *PIN6* 的表达谱, 结果显示 *PgPIN2* 与 *PgPIN6* 主要在人参地下根与根茎中表达, *PgPIN3* 在人参的叶子、果实及根中均有很高的表达; 采用序列同源比对、RT-PCR 扩增测序及生物信息学分析方法, 确认了人参 3 个 *PIN* 基因成员 *PgPIN2*、*PgPIN3* 与 *PgPIN6*; 采用实时荧光定量 PCR 技术分析人参不定根、组培苗不同部位的表达模式, 发现 *PgPIN3* 与 *PgPIN6* 在人参不定根根尖表达高, *PgPIN2* 在人参组培苗根部表达高, *PgPIN3* 在人参组培苗的叶中表达高。人参 *PIN* 基因的组织特异性表达表明 *PgPIN2*、*PgPIN3* 与 *PgPIN6* 对根的生长发育及向性生长很可能具有相应的功能, *PIN3* 对人参植株地上部分的生长具有较重要的意义, 可为后期深入挖掘其对人参向性生长等功能奠定基础。

**关键词:** 人参; 生长素; *PIN* 基因; 表达分析

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 04-0641-06

## Expression analysis of polar auxin transport mediated gene *PIN* in *Panax ginseng*

LIU Juan<sup>1</sup>, CHEN Tong<sup>1</sup>, YUAN Yuan<sup>1\*</sup>, JI Rui-feng<sup>1</sup>, GUO Juan<sup>1</sup>, WANG Ying-ping<sup>2</sup>,  
WANG Guo-liang<sup>3</sup>, HUANG Lu-qi<sup>1\*</sup>

(1. National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Institute of Special Animal and Plant, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, China; 3. Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:** Polar auxin transport gene *PIN* (PIN-FORMED) determines the concentration gradient of auxin and plays an important role in development and secondary metabolism of plants. This study was designed to analyze the bioinformatics and expression of the *PIN* genes in *Panax ginseng* to explore a novel way of breeding ginseng varieties. Heatmap and cluster analysis of *PIN2*, *PIN3*, *PIN6* was performed in four-year-old Jilin ginseng. Sequence homology alignment, RT-PCR amplification, sequencing and bioinformatics analysis were used to identify three *PIN* family genes *PgPIN2*, *PgPIN3* and *PgPIN6* in *P. ginseng*. *PIN* expression in ginseng adventitious root and culture seedling was analyzed with qRT-PCR technique. Results suggested that in ginseng adventitious root tip, *PgPIN3* and *PgPIN6* exhibited a high level of expression; in ginseng culture seedling root, *PgPIN2* showed a high level of expression; in four-year-old Jilin ginseng at the fruit ripening stage, *PgPIN2* and *PgPIN6* were highly expressed in root and rhizome, while *PgPIN3* had a high level in ginseng leaf,

收稿日期: 2016-12-19; 修回日期: 2017-02-14.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81603235); 国家杰出青年科学基金项目 (81325023); 名贵中药资源可持续利用能力建设项目 (2060302); 中国中医科学院中药资源中心自主选题研究项目课题 (ZZ2016006).

\*通讯作者 Tel: 86-10-84044340, E-mail: huangluqi01@126.net;

Tel: 86-10-64087649, E-mail: y\_yuan0732@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-1195

fruit and root. Tissue specific expression profile showed that *PgPIN2* and *PgPIN6* probably were involved in the development and tropism growth in ginseng roots, while *PIN3* might be in relation to the growth and development of the aerial part of plants.

**Key words:** *Panax ginseng*; auxin; *PIN*; expression analysis

人参 (*Panax ginseng* C. A. Mey) 为五加科多年生宿根草本植物, 在我国已有 5 000 多年的用药历史<sup>[1]</sup>, 具有大补元气、复脉固脱、补脾益肺、生精养血、安神益智的功效<sup>[2]</sup>。人参皂苷 (ginsenoside) 是人参的主要活性成分<sup>[3]</sup>, 广泛作用于心脑血管系统、中枢神经系统、免疫系统等方面<sup>[4, 5]</sup>, 是一类极具药用价值的化学物质。大量研究表明, 植物激素可以调控人参皂苷的合成<sup>[6, 7]</sup>、提高光合速率与抗氧化酶系统活性<sup>[8, 9]</sup>、促进根的生长发育<sup>[10]</sup>, 其种类与时空分布显著影响人参的发育及次生代谢。生长素是第一个被发现的植物激素, 在植物生长发育过程中如顶端优势、花序和叶序发育、胚的发育、主根发育、侧根和不定根发生、向性生长及维管组织的分化等扮演着重要角色<sup>[11]</sup>。已有研究表明, 生长素可以促进人参皂苷合成, 对人参根的生长也有重要调节作用<sup>[10, 12]</sup>, 因此探索生长素对人参生长发育的调控机制将有助于人参品种的改良。

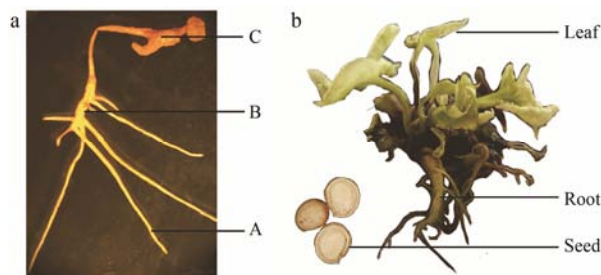
生长素对植物生长发育的调节主要依赖于极性运输形成的生长素浓度梯度<sup>[11]</sup>, *PIN* (pin-formed) 基因是公认的生长素极性运输基因<sup>[13]</sup>。拟南芥 *PIN* 蛋白家族有 *PIN1*~*PIN8* 共 8 个成员, 广泛作用于多个生长发育阶段。其中, *PIN2* 主要作用于植物根的向地性<sup>[14]</sup>, *PIN3* 主要作用于茎和根的向性生长<sup>[15]</sup>, *PIN6* 主要作用于根与花的发育<sup>[16, 17]</sup>。本文首次研究了人参生长素极性运输基因 *PIN* 在不同部位的表达情况, 为进一步挖掘 *PIN* 基因的功能、解析生长素分布对人参皂苷合成及人参生长发育的调控奠定理论基础。

## 材料与amp;方法

**材料** 取人参种子, 用 70% 乙醇水溶液浸泡 3 min, 然后用 1% 次氯酸钠浸泡 30 min, 灭菌去离子水洗 3 遍, 将已成熟的胚状体从种子中转移出来, 并在含有 1% 蔗糖的 1/2 MS 固体培养基中  $25 \pm 2$  °C 培养 3 周 (16 h 光照/8 h 黑暗), 萌发后的材料转移到分化培养基 (MS+3 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+5 mg·L<sup>-1</sup> NAA+1 mg·L<sup>-1</sup> IAA) 中诱导成苗。组培苗的叶柄切成 1.0 cm 长, 作为诱导人参不定根的外植体。将外植体在 1/2 MS (含 3.0 mg·L<sup>-1</sup> IBA) 固体培养基中  $25 \pm 2$  °C 暗培养 4 周, 待外植体形成不定根后将其分离, 并继代到 1/2 MS 液体培养基 (含 3.0 mg·L<sup>-1</sup> IBA) 中  $25 \pm 2$  °C 暗培养。

3 周继代一次, 12 周后, 不定根生长稳定快速, 可作为后续的实验材料使用。

**总 RNA 提取与单链 cDNA 合成** 人参不定根分为根尖 1 cm (A)、有分支部位 (B)、棕黄色老根 (C) 3 个部位 (图 1a), 人参组培苗分为根、叶及种子 3 个部位 (图 1b)。取人参组培苗及不定根不同部位的样品用液氮研磨粉碎, 根据 TRIzol Plant RNA Kit (Life Technologies) 说明书提取总 RNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳 (Bio-Rad) 确定 RNA 完整性, 核酸/蛋白定量仪 (NanoDrop 2000, Thermo) 测定 RNA 含量。cDNA 合成按 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit (大连宝生物工程技术有限公司) 说明书进行并作为 PCR 反应的模板。



**Figure 1** Three parts of adventitious roots (a) and three parts culture seedlings (b) of *P. ginseng*. A: Root tips; B: Branching roots; C: Old roots

**引物的设计与合成** 根据拟南芥 *PIN* 基因核酸序列信息, 在人参基因组中进行同源序列比对分析, 获得人参 *PIN* 基因序列, 运用 PCR 扩增并测序确认了 3 条人参 *PIN* 基因, 根据这 3 条序列信息设计并验证了 3 对荧光定量 PCR 引物 *PIN2*-F/R、*PIN3*-F/R 和 *PIN6*-F/R; 以人参 *IF3G1* 基因为内参, 序列同文献<sup>[18]</sup>。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 见表 1。

**实时荧光定量 PCR** 利用实时荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems 7500) 检测上述基因在人参不定根不同部位的表达模式。实时荧光定量 PCR 反应体系为 SYBR Premix Ex *Taq* 酶 (大连宝生物工程技术有限公司) 5 μL、上下游引物 (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 各 0.5 μL、ROX 0.25 μL、cDNA 模板 (100 mg·L<sup>-1</sup>) 1 μL, 加水补足至 10 μL, 每个反应体系至少重复 3 次。扩增程序如下: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火延伸 34 s

**Table 1** Primers of real-time PCR

Gene name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>IF3G1</i>	GCGAACTAGAATATTTTCATCTCCA	AGAAGAGAAGGGATAACAATTCAT
<i>PIN2</i>	AGTGCCTCTCTGCGTCTGA	GGCGAACCATCTCCATTTCAATC
<i>PIN3</i>	TTCCGCTCTTGATTGCCATGTATG	CCGATCTCCGCATCCGTCTCTA
<i>PIN6</i>	CGCCGTCCGTTTATCTTTCCAT	GTTGCACCATAAGGCTCTGAGTGA

(每次循环后采集荧光信号), 40 个循环; 95 °C 变性 10 s, 65~95 °C 做熔解曲线分析, 每个温度以每步 0.5 °C 上升, 停留 5 s, 获得每个基因的 Ct 值进行相对表达量分析。

**基因相对表达量的计算** 人参不定根基因表达的计算是以不定根 C 部位作为基准参比部位, 计算 5 个基因在 A、B、C 部位的相对表达量; 人参组培苗基因表达的计算是以种子作为基准参比部位。利用美国 ABI 公司 SDS V2.3 软件对 PCR 过程的数据进行收集和分析, 然后计算样品基因相对表达量, 计算公式为:  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[(Ct \text{ 目的基因} - Ct \text{ 管家基因})_{\text{待测组}} - (Ct \text{ 目的基因} - Ct \text{ 管家基因})_{\text{对照组}}]}$ 。

**人参转录组热图聚类分析** 将 NCBI SRA (Sequence Read Archive) 库中 4 年生果期吉林人参不同组织部位转录组数据 (SRR2952867~SRR2952880) 进行重头拼接, 构建完整的转录本库, 运用已获得的 3 条人参 *PIN* 基因序列进行比对, 筛选出 5 条 *PIN2*、4 条 *PIN3* 和 1 条 *PIN6* 同源基因。运用 HcmI 软件 (Heatmap Illustrator, version 1.0) 对基因表达进行聚类分析, 分析这 10 个 *PIN* 家族基因在吉林人参不同组织部位的表达模式。

**基因表达相关性分析** 利用 SPSS 20.0 软件对人参不同组织部位的 5 个基因表达进行 Pearson 相关性分析,  $|r| > 0.7$  说明两者呈现高度线性相关,  $0.7 \geq |r| \geq 0.5$  说明两者呈现中度线性相关,  $0.5 \geq |r| \geq 0.3$  则两者呈现低度相关,  $|r| < 0.3$  两者相关性极低,  $P \leq 0.05$  为显著水平,  $P \leq 0.01$  为极显著水平<sup>[19]</sup>。

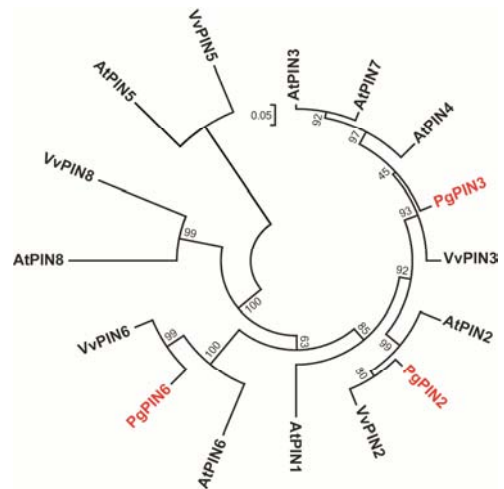
## 结果与讨论

### 1 人参 *PIN* 基因的生物信息学分析

根据拟南芥 *PIN* 家族基因的序列信息从人参基因组搜寻人参同源的 *PIN* 基因序列, 经过 PCR 扩增及测序, 筛选到 3 条 *PIN* 基因序列。通过 BLASTn 比对分析, 对这 3 条序列进行命名, 以核苷酸相似度最高的序列为准 (Query cover、E-value、Identities 综合判断)。与 *Daucus carota* subsp. *sativus* 的 *PIN2* (GenBank 号为 XM\_017388497.1) 相似度最高的人参 *PIN* 序列命名为 *PgPIN2* (Query cover=92%, Identities=82%, E-value=0.0), 与 *Camellia sinensis* 的 *PIN3*

(GenBank 号为 KP896474.1) 相似度最高的人参 *PIN* 序列分别命名为 *PgPIN3* (Query cover=63%, Identities=79%, E-value=0.0), 与 *Vitis vinifera* 的 *PIN6* (GenBank 号为 XM\_010666578.2) 相似度最高的人参 *PIN* 序列命名为 *PgPIN6* (Query cover=91%, Identities=77%, E-value=0.0)。

运用 MEGA5.05 构建人参与拟南芥、葡萄 *PIN* 的系统发育树, 结果显示: *PgPIN6* 与拟南芥、葡萄 *PIN6* 聚为一支, *PgPIN2* 与拟南芥、葡萄 *PIN2* 聚为一支; *PgPIN3* 与葡萄 *VvPIN3*、拟南芥 *AtPIN3*、*AtPIN4*、*AtPIN7* 聚为一支。研究表明, 拟南芥 *AtPIN2* 主要与根向地性生长有关<sup>[14]</sup>, *AtPIN3* 主要在茎和根的向性生长中起作用<sup>[15]</sup>, 而 *AtPIN6* 主要与植物蜜腺、雄蕊、初生根与不定根的生长发育相关<sup>[16, 17]</sup>, 系统发育树分析表明, *PgPIN2*、*PgPIN6* 与拟南芥 *PIN* 相似度高, *PgPIN3* 与拟南芥的 *PIN3* 有一定差别 (图 2)。因此, 有必要对人参 *PIN* 家族基因的表达进行测定, 为进一步挖掘 *PgPIN2*、*PgPIN3*、*PgPIN6* 在人参中的功能奠定基础。



**Figure 2** Phylogenetic analysis of protein sequences of *P. ginseng* *PgPINs*, *Arabidopsis thaliana* *AtPINs* and *Vitis vinifera* *VvPINs*. GenBank Number of *AtPINs*: *AtPIN1*-NP\_177500.1, *AtPIN2*-NP\_568848.1, *AtPIN3*-NP\_177250.1, *AtPIN4*-NP\_565261.1, *AtPIN5*-NP\_197157.4, *AtPIN6*-NP\_177836.1, *AtPIN7*-NP\_001077584.1, *AtPIN8*-NP\_197014.1; GenBank Number of *VvPINs*: *VvPIN2*-XP\_002266059.1, *VvPIN3*-XP\_002284302.1, *VvPIN5*-XP\_002279191.1, *VvPIN6*-XP\_010664880.1, *VvPIN8*-XP\_002282480.1

## 2 人参不同组织部位 *PIN* 基因转录组的数据分析

为了系统研究人参不同组织部位 *PIN* 家族基因的表达模式, 下载、拼装了 NCBI SRA (Sequence Read Archive) 数据库中 4 年生果期吉林人参不同组织部位的转录组数据 (SRR2952867~SRR2952880)。通过序列同源比对, 从中鉴定出 4 条 *PgPIN2* 的 unigene、5 条 *PgPIN3* 的 unigene、1 条 *PgPIN6* 的 unigene。基因表达热图聚类分析发现, 转录组中 5 条 *PgPIN3* 基因在叶 (叶片、总叶柄、小叶柄)、支根表达比较高, 其中 DN427\_c0\_g1 与 DN120678\_c0\_g1 具有相似的表达模式; *PgPIN2* 基因表达模式类似, 均在芋、支根、须根、芦头表达较高; *PgPIN6* 主要在须根、支根、芋、芦头中表达较高 (图 3)。从结果可以推测, *PgPIN3* 对人参植株地上部分的生长具有较重要的意义, *PgPIN2* 及 *PgPIN6* 对人参植株地下部分的生长具有重要意义。

## 3 人参组培苗 *PIN* 基因表达模式分析

分析了 *PgPIN* 在人参组培苗中的叶、根及最初

诱导组培苗的种子这 3 个部位的表达模式 (图 4)。*PgPIN2* 在人参组培苗的根中表达最高, 说明 *PgPIN2* 很可能对人参根的生长具有重要作用; *PgPIN3* 在人参组培苗叶、种子、根中的表达依次降低, 表明 *PgPIN3* 可能对人参地上部分的极性生长具有调控作用, 这与转录组数据分析相一致; *PgPIN6* 在人参组培苗根和种子中表达高, 而叶中表达很低, 表明 *PgPIN6* 主要对人参的地下部位生长具有作用, 而对地上部位的发育作用较小。

## 4 人参不定根 *PIN* 基因表达模式分析

为了进一步了解 *PgPIN2*、*PgPIN3* 和 *PgPIN6* 的功能, 利用实时荧光定量 PCR 分析了 *PgPIN* 在人参不定根 3 个部位表达情况 (图 5)。结果显示, *PgPIN2* 在人参不定根 B 段 (不定根分支处) 表达较低, 而在不定根 A 段与 C 段没有显著差异; *PgPIN3* 与 *PgPIN6* 在人参不定根 A 段 (不定根根尖处) 显著高于 B 段和 C 段 ( $P < 0.01$ ), 表现出显著的表达偏好性, 暗示这

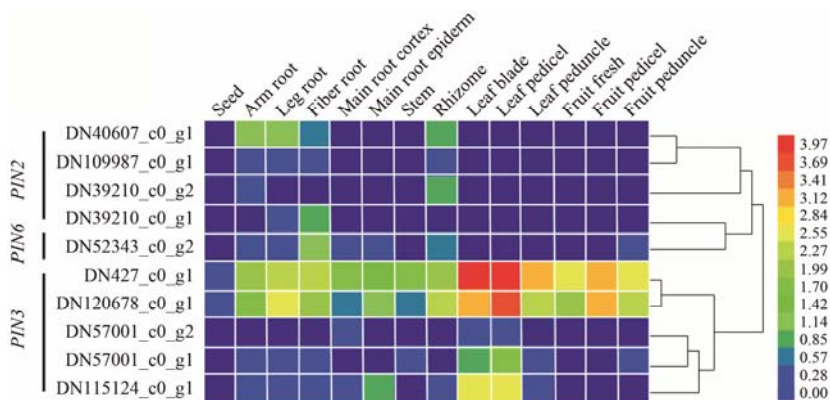


Figure 3 Heatmap and cluster analysis of *PgPINs* in different organs of four-year-old Jilin ginseng at the fruit ripening stage

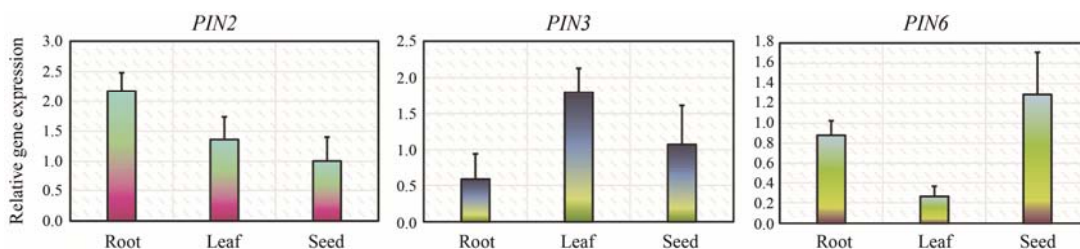


Figure 4 Expression analysis of *PgPINs* in different parts of *P. ginseng* culture seedlings ( $n \geq 3$ )

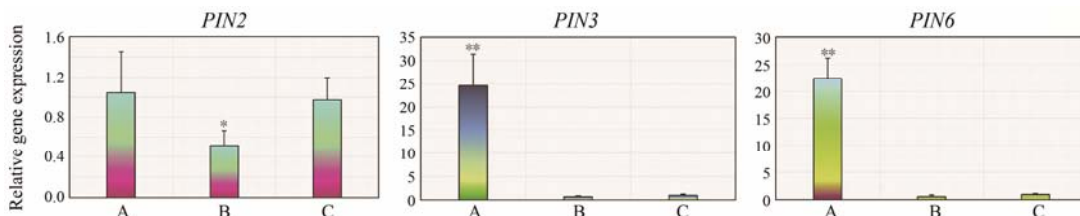


Figure 5 Expression analysis of *PgPINs* in different parts of adventitious root of *P. ginseng* ( $n \geq 3$ ). A: Root tips; B: Branching roots; C: Old roots

两个基因可能在不定根的生长发育及向性生长具有相应的功能。

## 5 人参 *PIN* 表达相关性分析

有研究表明, *PIN* 蛋白在细胞水平的生物学功能相同, 即将生长素从胞内输出胞外或输入某种细胞器内, 但 *PIN* 家族基因的表达既有组织和器官的特异性又有重叠<sup>[13]</sup>, 因此有必要对这几个基因表达的相关性进行分析。通过 Pearson 相关性分析可以发现, 在人参不定根中, *PgPIN3* 及 *PgPIN6* 之间的表达呈显著正相关 ( $r > 0.9$ ,  $P < 0.01$ ), 两者主要在人参不定根的根尖中表达; 在人参组培苗中, 三者表达相关性并不显著。从结果可以看出, 在人参组培苗的不同器官中 *PgPIN2*、*PgPIN3* 与 *PgPIN6* 的表达相差较大, 在人参不定根不同部位中 *PgPIN3* 与 *PgPIN6* 的表达具有一定程度的重叠 (表 2)。

**Table 2** Pearson correlation analysis of *PgPINs*

Gene	Adventitious root			Culture seedling		
	<i>PgPIN2</i>	<i>PgPIN3</i>	<i>PgPIN6</i>	<i>PgPIN2</i>	<i>PgPIN3</i>	<i>PgPIN6</i>
<i>PgPIN2</i>	1	0.556	0.333	1	-0.312	-0.057
<i>PgPIN3</i>	0.556	1	0.904	-0.312	1	-0.471
<i>PgPIN6</i>	0.333	0.904	1	-0.057	-0.471	1

## 讨论

生长素是植物体内唯一具有极性运输特点的激素, 它参与植物的形态建成、向性反应、调控组织的伸长生长及维管束分化、参与胚胎发育、光形态建成等<sup>[13]</sup>。*PIN* 是一类编码生长素极性运输载体元件的基因家族, 参与植物器官的发生发育、根的向地性及其他向性反应、根的伸长生长及早期的胚胎发育等过程<sup>[13, 20]</sup>。本研究首次对人参的 *PIN* 基因进行生物信息学预测分析及表达研究, 这也是人参属植物第一次报道该基因。

通过序列同源比对和 RT-PCR 验证, 筛选出 3 条人参 *PIN* 基因序列 *PgPIN2*、*PgPIN3* 及 *PgPIN6*。系统发育分析显示人参的 *PgPIN* 与拟南芥及葡萄相应的 *PIN* 基因聚在一起, 表明人参 *PgPIN* 具有较高的功能保守性。检测了人参不同材料及组织部位 *PIN* 基因的表达模式, 并结合拟南芥中 *PIN* 的同源基因分析 *PgPIN* 相应的功能。拟南芥 *AtPIN2* 在根中特异表达, 参与根的向地性反应并调节生长素在根部分生组织中的不对称分布<sup>[14, 21]</sup>, *PgPIN2* 主要在人参地下非主根部位 (芦、支根、须根、芦头) 中表达, 这些部位存在较多比例的原分生组织和初生分生组织, 表明 *PgPIN2* 很可能与生长素在人参根部分生组织的

极性运输有关。拟南芥 *AtPIN3* 能够响应重力刺激, 控制细胞中生长素的侧向分配, 调控植物的向性生长<sup>[15]</sup>, *PgPIN3* 在人参不定根根尖、人参组培苗叶中表达较高, 而 *PgPIN3* 在吉林人参中的叶子、果实及根中都有表达, 说明 *PIN3* 对人参各器官的极性生长都具有重要意义。*AtPIN6* 能够调控拟南芥蜜腺、雄蕊、初生根、侧根与不定根的生长发育<sup>[16, 17]</sup>, *PgPIN6* 在人参不定根根尖及人参的地下部分表达明显, 说明人参的 *PgPIN6* 可能主要用于调控根的生长发育。

本研究的开展为发掘人参向性生长提供基础数据, 为人参根的形态构建提供新思路, 为人参优良品种的选育奠定基础。同时, 不同器官对人参 *PIN* 基因的表达模式有明显影响, 因此, *PIN* 基因也可以作为潜在鉴定人参不同部位入药的标记基因。人参 *PgPIN* 基因如何调控人参不同器官的生长发育, 它们之间存在怎样的关系均有待进一步研究。

## References

- [1] Hemmerly TE. A ginseng farm in Lawrence County, Tennessee [J]. Econ Bot, 1977, 31: 160-162.
- [2] Chinese Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Vol 1. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 8.
- [3] Im D, Nah S. Yin and Yang of ginseng pharmacology: ginsenosides vs gintonin [J]. Acta Pharmacol Sin, 2013, 34: 1367-1373.
- [4] Kang S, Min H. Ginseng, the 'immunity boost': the effects of *Panax ginseng* on immune system [J]. J Ginseng Res, 2012, 36: 354-368.
- [5] Zhao Y, Zhang F, Qu S, et al. The main component of pharmacological research about ginseng in the last three years [J]. Asia-Pacific Tradit Med (亚太传统医药), 2012, 8: 171-174.
- [6] Oh JY, Kim YJ, Jang MG, et al. Investigation of ginsenosides in different tissues after elicitor treatment in *Panax ginseng* [J]. J Ginseng Res, 2014, 38: 270-277.
- [7] Yu LL. The Related Gene Expression of the Ginsenosides Synthesis Regulated by Elicitor in Ginseng Hair Roots (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]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2014.
- [8] Cao WL. Effect of salicylic acid on photosynthesis, physio-biochemistry and quality of *Panax ginseng* under full sun shine in spring [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2015, 40: 3553-3559.
- [9] Zhang Y, Wang Y, Jiang S, et al. Cloning of the differential

- expression fragment from ginseng culture induced by salicylic acid [J]. *Gen Appl Biol* (基因组学与应用生物学), 2009, 28: 245–250.
- [10] Washida D, Shimomura K, Takido M, et al. Auxins affected ginsenoside production and growth of hairy roots in *Panax* hybrid [J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27: 657–660.
- [11] Ren Y, Dai S, Liu W. Auxin transport and its roles in signal transduction and plant development [J]. *Biotechnol Bull* (生物技术通报), 2012, 3: 9–16.
- [12] Xiu J, Lian M, Piao C, et al. Effect of auxins and cytokinins on cell growth and ginsenoside production of *Panax ginseng* during suspension culture [J]. *J Agric Sci Yanbian Univ* (延边大学农学学报), 2011, 33: 83–88.
- [13] Liu SP, Wang L, Wang JR, et al. *PIN* gene family in higher plants [J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 2009, 45: 833–841.
- [14] Chen R, Hilson P, Sedbrook J, et al. The *Arabidopsis thaliana* *AGRAVITROPIC 1* gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95: 15112–15117.
- [15] Friml J, Wiśniewska J, Benková E, et al. Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 2002, 415: 806–809.
- [16] Bender RL, Fekete ML, Klinkenberg PM, et al. PIN6 is required for nectary auxin response and short stamen development [J]. *Plant J*, 2013, 74: 893–904.
- [17] Cazzonelli CI, Vanstraelen M, Simon S, et al. Role of the *Arabidopsis* PIN6 auxin transporter in auxin homeostasis and auxin-mediated development [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e70069.
- [18] Wang M, Lu S. Validation of suitable reference genes for quantitative gene expression analysis in *Panax ginseng* [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 6: 1259.
- [19] Hazra A, Gogtay N. Biostatistics series module 6: correlation and linear regression [J]. *Indian J Dermatol*, 2016, 61: 593–601.
- [20] Zou C, Men S. Research advances in auxin efflux carrier PIN proteins [J]. *Chin J Cell Biol* (中国细胞生物学学报), 2013, 35: 574–582.
- [21] Blakeslee JJ, Peer WA, Murphy AS. Auxin transport [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8: 494–500.