

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

陆奇杰^{1,2}, 巢建国^{1*}, 谷巍¹, 张文明^{1,3}, 桑晓华¹

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 无锡药明生物技术股份有限公司, 江苏 无锡 214092

3. 无锡市中医医院 药学部, 江苏 无锡 214001

摘要: **目的** 研究铜胁迫对茅苍术药效成分 β -桉叶醇、苍术酮和苍术素积累及其生物合成关键酶 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 (HMGR)、法呢基焦磷酸合酶 (FPPS) 基因表达的影响。 **方法** 在铜胁迫下, 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法测定茅苍术 HMGR、FPPS 的表达量; 采用高效液相色谱法测定茅苍术 3 种药效成分的含量; 采用 SPSS 软件对两者进行相关性分析, DPS 软件进行灰色关联度分析。 **结果** 当铜胁迫在 100 mg/kg 以内时, 茅苍术根茎内 FPPS 表达量与苍术酮含量略有增加; 但铜浓度继续增加时, HMGR、FPPS 表达量与 3 种药效成分含量呈不同程度的下降趋势。铜胁迫下 HMGR、FPPS 的表达量与 β -桉叶醇、苍术酮和苍术素的含量呈显著正相关 ($P < 0.05$)。灰色关联度分析发现铜胁迫下茅苍术根茎中 β -桉叶醇、苍术酮的含量与 HMGR、FPPS 的表达量关联较大, FPPS 基因的表达对 β -桉叶醇和苍术酮合成贡献较大, 但苍术素含量与这 2 种关键酶基因的表达关联度较小。 **结论** 阐明了铜胁迫下茅苍术 2 种关键酶基因表达量与 3 种药效成分含量的变化规律, 揭示了铜胁迫下茅苍术药效成分合成的分子调控机制, 为提高茅苍术药材的品质提供理论基础。

关键词: 铜胁迫; 茅苍术; β -桉叶醇; 苍术酮; 苍术素; 关键酶; 基因表达

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)03-0710-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.03.026

Effects of copper stress on accumulation of three medicinal compositions and expression of two key enzyme genes in biosynthesis of *Atractylodes lancea*

LU Qi-jie^{1,2}, CHAO Jian-guo¹, GU Wei¹, ZHANG Wen-ming^{1,3}, SANG Xiao-hua¹

1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. WuXi Biologics Co., Ltd., Wuxi 214092, China

3. Department of Pharmacy, Wuxi Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuxi 214001, China

Abstract: Objective To explore the effect on the accumulation of medicinal compositions β -eudesmol, atractylon, atractylodin and key enzyme genes 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR) and farnesyl pyrophosphate synthase (FPPS) expression in biosynthesis of *Atractylodes lancea* under copper stress. **Methods** Under copper stress, the expression of key enzyme genes HMGR and FPPS in *A. lancea* was determined by real-time fluorescence quantitative PCR; the content of three medicinal components in *A. lancea* were determined by HPLC; The correlation analysis was performed with SPSS, and DPS software for grey correlation analysis. **Results** When the copper stress concentration was within 100 mg/kg, the expression of FPPS and the content of atractylon in the rhizomes of *A. lancea* increased slightly. However, when the copper concentration continued to increase, the expression levels of HMGR and FPPS and three medicinal components content of *A. lancea* showed a different degrees of downward trend. The expression levels of HMGR and FPPS were positively correlated with the content of β -eudesmol, atractylon, and atractylodin ($P < 0.05$) under copper stress. Grey relational analysis showed that the content of β -eudesmol and atractylon in the rhizomes was significantly correlated with the expression of HMGR and FPPS of *A. lancea* under copper stress. The expression of FPPS gene had the larger contribution on the composition of β -eudesmol and atractylon. However, the correlation between the content of atractylodin and the expression of these two key enzyme genes was relatively small. **Conclusion** This study clarified the change regulation of two key enzyme gene expression and the content of three medicinal compositions, and revealed the relationship

收稿日期: 2018-06-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81573520); 江苏省中药优势学科 II 期建设 (ysxk-2014); 江苏省基础研究计划 (自然科学基金) 面上项目 (BK201713121); 2017 年中医药公共卫生服务补助专项“全国中药资源普查项目”(财社[2017]66 号)

作者简介: 陆奇杰 (1993—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药资源与资源化学。Tel: 13861716577 E-mail: luqijie0813@163.com

***通信作者** 巢建国 (1960—), 男, 硕士生导师, 教授, 研究方向为中药资源利用与品质评价。Tel: 13851562488 E-mail: jgchao1016@163.com

between β -eudesmol, atractylon and HMGR and FPPS, the key enzymes in terpene biosynthesis of *A. lancea* under copper stress. It contributed to the further study of the molecular regulation mechanism of the synthesis of medicinal constituents under copper stress and provided a theoretical basis for improving the quality of *A. lancea*.

Key words: copper stress; *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.; β -eudesmol; atractylon; atractylodin; key enzymes; gene expression

茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 为菊科苍术属多年生草本植物, 其根茎入药即为中药苍术^[1]。茅苍术主要的药效成分包括倍半萜类和聚乙炔类, 倍半萜类成分主要是 β -桉叶醇、苍术酮等, 而聚乙炔类成分主要是苍术素^[2-4]。倍半萜类成分主要通过甲羟戊酸 (mevalonic acid, MVA) 途径在植物体内合成^[5], 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A, HMGR) 主要催化 MVA 的生成^[6], 法呢基焦磷酸合酶 (farnesyl pyrophosphate synthase, FPPS) 催化合成法呢基二磷酸 (farnesyl diphosphate, FPP), 而 FPP 是所有倍半萜化合物的前体^[7-8], 所以这 2 个酶在 MVA 生物合成途径中起重要作用。

茅苍术主产于江苏镇江句容地区, 随着地区经济的发展, 环境污染已是不可避免的问题, 茅山地区的土壤也遭受着重金属污染^[9]。铜元素是植物生长发育的必要元素, 但铜也是重金属元素, 其含量过高会对植物产生毒害^[10], 进而影响植物的生长发育。近年来随着对茅苍术的深入研究, 有学者发现了茅苍术根茎中倍半萜类成分生物合成途径中这 2 个关键酶基因 HMGR、FPPS, 但在铜胁迫下它们对茅苍术药效成分的调控机制尚不清楚, 而且有关铜胁迫对茅苍术药效成分积累及关键酶基因表达影响的研究未见报道。因此, 本研究以茅苍术为材料, 对铜胁迫下茅苍术关键酶基因 HMGR 和 FPPS 的表达量进行测定, 用高效液相色谱仪测定了铜胁迫下茅苍术 3 种药效成分含量的变化, 分析了铜胁迫对茅苍术药效成分及其关键酶基因表达的影响, 以期阐明铜胁迫下茅苍术药效成分合成的分子调控机制, 为提高茅苍术药材的品质提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 材料

样品茅苍术取自于南京中医药大学药苑苍术种质资源圃, 经南京中医药大学中药资源与鉴定系巢建国教授鉴定为菊科植物茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC., 采集后挑选无病虫害及个体差异较小的进行下一步实验。

1.2 试剂与仪器

总 RNA 提取试剂盒 (北京天根生化科技有限

公司); 反转录试剂盒、实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司); 甲醇、乙腈 (色谱纯, 美国 Tedia 公司); 磷酸 (色谱纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 五水硫酸铜 (分析纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 对照品苍术素 (批号 160110)、苍术酮 (批号 160204)、 β -桉叶醇 (160210) (质量分数大于 98%, 上海源叶生物科技有限公司); 7500 型 qRT-PCR 仪 (美国 ABI 公司); SIGMA3-18K 高速冷冻离心机 (北京博励行仪器有限公司); UxF40086V 超低温冰箱 (美国 Thermo 公司); E2695 型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); KQ-500B 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); FA1104N 型电子分析天平 (上海菁华仪器有限公司)。

2 方法

2.1 铜胁迫处理

采用盆栽实验方法, 土样取自南京中医药大学药苑, 晒干捣碎过筛后称取 8 kg 置于带托盘方形塑料花盆中。选取大小长势基本一致的 6 株茅苍术种植于方形花盆内, 按照国家土壤环境质量标准 GB 15618-2008 确定铜胁迫浓度。以蒸馏水为对照组称取五水硫酸铜配制 6 个铜胁迫质量分数分别为 100、300、500、700、900 mg/kg, 每盆浇灌不同铜浓度的培养液 500 mL, 将托盘中渗出的水分重新倒入盆中以防止铜离子的缺失, 每个处理重复 5 次。之后正常田间管理, 以蒸馏水补充土壤损失的水分。

2.2 茅苍术样品处理

在采集时间内挖取不同铜浓度处理的茅苍术新鲜根茎, 用蒸馏水洗净后吸去表面的水分, 再将根茎剪成小块分装于冻存管中, 用液氮速冻后置于 -80°C 超低温冰箱进行后续实验。将剩余的茅苍术根茎洗净后置于烘箱中烘干, 打粉过筛后用于药效成分的测定。

2.3 茅苍术总 RNA 的提取与逆转录

取 -80°C 贮存的茅苍术根茎在液氮中研磨成细粉, 根据 Tiangen 公司的总 RNA 提取试剂盒步骤提取总 RNA, 采用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳结合 Bio-Rad Gel Doc XR⁺ 凝胶成像系统对得到的总 RNA 进行完整性检测, 采用 Eppendorf 蛋白核酸分

析仪对得到的总 RNA 进行浓度及纯度的检测。根据美国 Invitrogen 公司的反转录试剂盒的操作步骤将总 RNA 逆转录成 cDNA 并置于 -20°C 保存。

2.4 引物设计

根据本课题组的相关研究结果可得,选择茅苍术转录数据库中的 EF-1 α 作为内参基因来进行关键酶基因 HMGR 和 FPPS 的表达分析^[11],引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of qRT-PCR

基因	序列 (5'→3')	扩增长度/bp
EF-1 α	正向 ACCAACTGGGTTGACAACTGAAGT	64
	反向 AGCCTCGGTAAGGGCTTCAT	
HMGR	正向 AAACAACATAATCCGCGCAACT	61
	反向 AGGCGTCGATGGCTTTTG	
FPPS	正向 CTGCCCTTGGTTGGTGCGTT	206
	反向 TTCTTGGGACATGGTTGCGA	

2.5 实时荧光定量 PCR 分析

采用 qRT-PCR 试剂盒及 7500 型 qRT-PCR 仪进行 qRT-PCR 扩增,每个样品重复 3 次,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析结果,不同铜浓度梯度关键酶基因的表达量以对照组根茎中的表达量为对照。反应体系为双蒸水 3.6 μL , $2\times$ Power qPCR PreMix 10 μL , 正向引物和反向引物各 2 μL , $50\times$ Rox Reference Dye 0.4 μL , cDNA 模板 2 μL , 总共 20 μL 。反应程序为 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 30 s, 62°C 退火 30 s, 72°C 延伸 40 s, 45 个循环。

2.6 茅苍术 3 种药效成分的测定

2.6.1 对照品溶液的制备 精密称取 β -桉叶醇、苍术酮和苍术素的对照品适量,置棕色量瓶中,加甲醇制成质量浓度分别为 0.304、0.290、0.153 mg/mL 的混合对照品溶液。

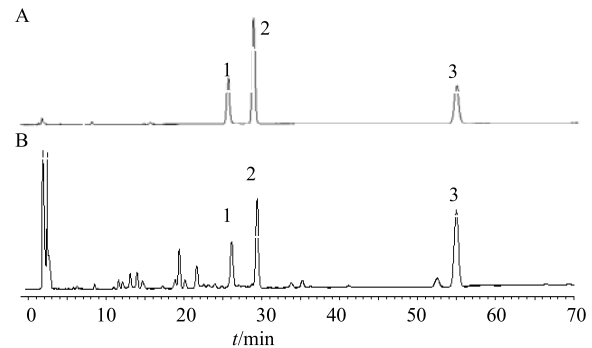
2.6.2 供试品溶液的制备 精密称取不同质量分数铜胁迫的茅苍术根茎粉末 0.500 g,置棕色具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,密塞称定质量,超声提取 60 min,放冷后再次称定质量,加甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜后得供试品溶液。

2.6.3 色谱条件 色谱柱 Agilent HC-C₁₈ Analytical 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm),检测波长 203 nm,体积流量 1.0 mL/min,柱温 25°C ,梯度洗脱条件见表 2。色谱图见图 1。

表 2 梯度洗脱条件

Table 2 Mobile phase composition for gradient elution

时间/min	乙腈/%	0.1%磷酸水溶液/%
0	60	40
5	60	40
15	65	35
35	72	28
50	75	25
70	85	15



1-苍术素 2- β -桉叶醇 3-苍术酮
1-atractylodin 2- β -eudesmol 3-atractylon

图 1 混合对照品 (A) 和铜胁迫下茅苍术供试品 (B) HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substance (A) and trial products of *A. lancea* under copper stress (B)

2.6.4 标准曲线的绘制 取对照品溶液适量,测定对照品苍术素、苍术酮、 β -桉叶醇的峰面积,以对照品浓度为横坐标 (X),峰面积为纵坐标 (Y),得到标准曲线。苍术素 $Y=59\,581\,025.903\,20X+29\,004.693\,25$, $r^2=0.999\,77$; 苍术酮 $Y=18\,271\,462.343\,98X-449.668\,71$, $r^2=0.999\,97$; β -桉叶醇 $Y=13\,362\,807.152\,08X+10\,927.785\,28$, $r^2=0.999\,71$ 。方法学考察精密度、稳定性、重复性及加样回收率均符合要求。

2.6.5 样品测定 取 10 μL 供试品溶液注入高效液相色谱仪中检测,并按照标准曲线计算得到相应成分的质量分数。

2.7 数据处理与分析

采用 SPSS 22.0 软件进行数据处理及 Pearson 相关性分析,采用 DPS 7.05 进行灰色关联度计算^[12]。

3 结果与分析

3.1 铜胁迫对茅苍术关键酶基因表达的影响

铜胁迫下茅苍术关键酶基因 HMGR 和 FPPS 的相对表达量的变化如图 2 所示。HMGR 基因的表达量随着铜胁迫浓度的增加呈逐渐下降的趋势,且铜胁迫浓度越大, HMGR 基因的表达量下降越明显,

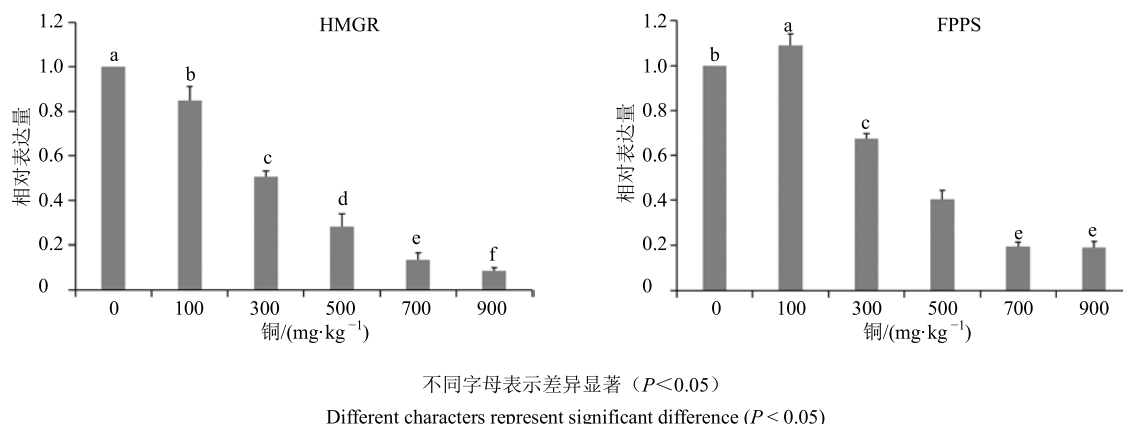


图 2 铜胁迫下茅苍术关键酶基因 HMGR 和 FPPS 相对表达量

Fig. 2 Relative expression of key enzyme genes HMGR and FPPS of *A. lancea* under copper stress

不同铜胁迫处理组 HMGR 基因的表达量均有显著性差异。当铜胁迫质量分数为 100 mg/kg 时, HMGR 基因的表达量为 0.848, 相较于对照组降低了 15.2%; 当铜胁迫质量分数为 900 mg/kg 时, HMGR 基因的表达量仅为 0.084, 相较于对照组降低了 92.6%, 所以高浓度的铜胁迫会较强抑制 HMGR 基因的表达。

FPPS 基因的表达量随着铜胁迫浓度的增加呈先增加后减少的趋势, 当铜胁迫质量分数为 100 mg/kg 时, FPPS 基因的表达量达到最大值为 1.088, 相较于对照组显著增加。之后随着铜浓度的增加, FPPS 基因的表达量显著下降。铜胁迫质量分数为 700 mg/kg 和 900 mg/kg 时, 两者 FPPS 基因的表达量没有显著性差异, 表达量差仅为 0.004。铜质量分数为 900 mg/kg 组 FPPS 基因的表达量相较于对照组的下降程度最大, 其 FPPS 基因表达量降低了 80.9%。因此铜胁迫浓度较低时会略微促进 FPPS 基因的表达, 浓度较高时则明显抑制其表达。

3.2 铜胁迫对茅苍术 3 种药效成分含量的影响

铜胁迫下茅苍术 3 种药效成分 β -桉叶醇、苍术酮和苍术素含量的变化见图 3, 茅苍术根茎中苍术酮和 β -桉叶醇的含量相对较高, 而苍术素的含量处于较低的水平, 这 3 个成分含量的变化趋势并不完全相同。茅苍术根茎中 β -桉叶醇的含量随着铜质量分数的增加呈逐渐下降的趋势, 铜质量分数在 100~500 mg/kg 时, β -桉叶醇的量下降的速度较为缓慢, 而铜质量分数达到 700 mg/kg 时 β -桉叶醇的量急剧下降, 相较于 500 mg/kg 组下降了 1.018%, 根茎中 β -桉叶醇的量在铜质量分数为 900 mg/kg 时最低仅

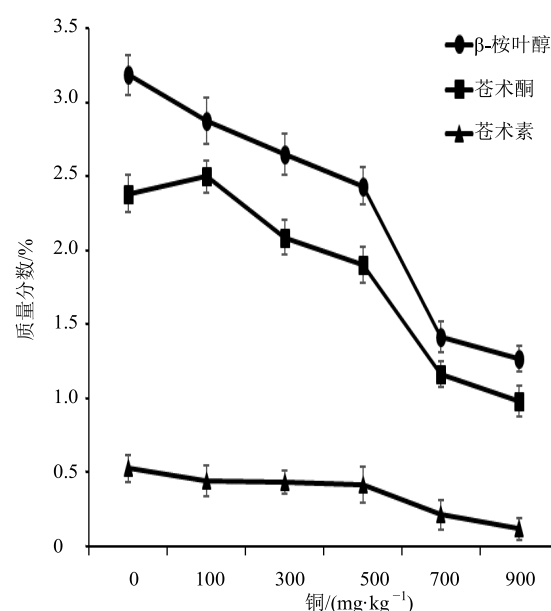


图 3 铜胁迫下茅苍术 3 种药效成分含量

Fig. 3 Content of three medicinal ingredients in *A. lancea* under copper stress

1.268%。茅苍术根茎中苍术酮的含量随着铜质量分数的增加呈先增加后减少的趋势, 在铜质量分数为 100 mg/kg 时, 苍术酮的含量达到最大值 2.499%, 之后随着铜质量分数的增加其变化趋势与 β -桉叶醇的变化趋势类似, 苍术酮的含量在铜为 900 mg/kg 时最小, 相较于对照组降低了 1.400%。茅苍术根茎中苍术素的含量随着铜质量分数的增加亦是呈逐渐下降的趋势, 在铜质量分数为 100~500 mg/kg 时, 苍术素质量分数变化不大, 500 mg/kg 组比对照组降低了 0.111%。当铜质量分数为 700 mg/kg 和 900 mg/kg 时, 苍术素的量分别降低 0.212% 和 0.117%。

3.3 铜胁迫下茅苍术关键酶基因表达量与 3 种药效成分含量的相关性分析

铜胁迫下茅苍术根茎中关键酶基因 HMGR 和 FPPS 表达量与 β -桉叶醇、苍术酮和苍术素含量相关性分析结果见表 3, 由此表明铜胁迫下 HMGR 基因的表达量与 3 种药效成分的量呈显著正相关, 且与 β -桉叶醇、苍术酮的相关性要大于苍术素, 而 FPPS 基因的表达量与苍术酮的含量呈极显著正相关, 与 β -桉叶醇、苍术素的含量呈显著正相关, 且与 β -桉叶醇、苍术酮的相关性也大于苍术素。

表 3 铜胁迫下茅苍术根茎中关键酶基因表达量与 3 种药效成分含量相关性

Table 3 Correlation of key enzyme gene expression and three pharmacodynamic components in rhizome of *A. lancea* under copper stress

药效成分	相关系数	
	HMGR	FPPS
β -桉叶醇	0.916*	0.914*
苍术酮	0.912*	0.943**
苍术素	0.852*	0.843*

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

*correlation is significant ($P < 0.05$); **correlation is very significant ($P < 0.01$)

3.4 铜胁迫下茅苍术关键酶基因表达量与 3 种药效成分含量的灰色关联度分析

通过 DPS 软件分析铜胁迫下茅苍术根茎中 β -桉叶醇、苍术酮和苍术素的含量与关键酶基因 HMGR、FPPS 表达量的灰色关联度。通过关联度的大小来确定关键酶基因和 3 种药效成分之间的关系, 关联度越大表明该关键酶基因对药效成分的贡献值越大^[13]。

将铜胁迫下茅苍术根茎中 β -桉叶醇、苍术酮和苍术素的含量和 HMGR、FPPS 表达量视为一个灰色系统, 3 种药效成分的含量分别为母序列, HMGR、FPPS 的表达量为子序列, 原始数据作标准化变换, 0.5 为分辨系数, $\Delta_{\min}$ 为各序列值的绝对差值。铜胁迫下 HMGR、FPPS 的表达量与 β -桉叶醇、苍术酮和苍术素含量的灰色关联度结果见表 4。由此表明铜胁迫下 FPPS 基因的表达对 β -桉叶醇和苍术酮合成贡献较大, 它是铜胁迫下影响这 2 种成分积累的主导因子, β -桉叶醇的含量变化与 FPPS 基因表达的灰色关联度最高关系最为密切。而这 2 个关键酶基因表达量与苍术素含量的灰色关联度都较低, 说明铜胁迫下它们对苍术素的合成贡献都较低。

表 4 铜胁迫下茅苍术根茎中关键酶基因表达量与 3 种药效成分含量灰色关联度

Table 4 Grey correlation degrees between key enzyme gene expression and three pharmacodynamic components in rhizome of *A. lancea* under copper stress

药效成分	灰色关联度	
	HMGR	FPPS
β -桉叶醇	0.640 1	0.705 6
苍术酮	0.623 8	0.699 3
苍术素	0.589 2	0.623 1

4 讨论

铜作为一种植物生长的必要微量元素, 对植物的代谢过程起非常重要的调节作用^[14]。但过量的铜元素会对植物产生一种毒性效应, 影响着植物体内的各种基因的表达量和有效成分的含量。贾鹏等^[15]通过从苦荞叶片中克隆得到 FtMT2 基因发现其对铜离子有一定的耐受性, 王川等^[16]通过研究发现铜胁迫下丹参根系中酚酸类成分及丹参酮类成分都有不同程度的降低。本研究发现, 随着铜胁迫质量分数增加, 关键酶基因 HMGR 的表达量随之减少, 说明铜胁迫显著影响了 HMGR 基因的正常表达。同时 HMGR 作为萜类化合物合成途径中的关键酶, 其表达量的多少决定着许多有效药用活性成分产量的多少^[17], 所以 β -桉叶醇和苍术酮这 2 种倍半萜类化合物的含量在总体上呈下降的趋势。但关键酶基因 FPPS 在铜胁迫浓度较低的情况下其表达量增加, 说明 FPPS 基因对铜离子有一定的耐受性, 较低浓度的铜离子有促进其表达的作用。之后随着铜胁迫质量分数的增加, FPPS 基因的表达量显著减少, 说明较高质量分数的铜胁迫会破坏其正常的基因表达。FPPS 基因作为倍半萜类化合物的前体, 其表达量显著影响这类化合物的生物合成, 苍术酮含量的变化趋势与 FPPS 基因表达量的变化趋势基本一致正是说明了 FPPS 基因的重要性。茅苍术根茎中苍术素含量也是不断减少的, 这应该是铜胁迫质量分数的加大也会影响这类聚乙炔类化合物的生物合成, 最终导致苍术素含量的降低, 还需进行进一步研究。

本研究发现铜胁迫下茅苍术根茎中萜类生物合成关键酶基因 HMGR、FPPS 的表达量与 β -桉叶醇、苍术酮的含量表现出显著的正相关, 证明这 2 种关键酶与药效成分有着很紧密的关系。铜胁迫下首先影响了茅苍术体内关键酶基因的表达, 进而通

过基因的调控作用影响药效成分的合成积累。而苍术素的含量变化与这2种关键酶也显示出了一定的相关性,这可能是由于铜胁迫的影响造成合成苍术素相关基因表达的降低进而使苍术素含量降低。灰色关联度分析表明铜胁迫下关键酶基因 HMGR、FPPS 的表达对于 β -桉叶醇、苍术酮含量的贡献度较大,这也同时证明2个关键酶在调控 β -桉叶醇、苍术酮合成中起主导作用,对于茅苍术药效成分 β -桉叶醇、苍术酮的合成积累有重要影响。苍术素含量与这2种关键酶的灰色关联度不高,说明苍术素的合成不是这2种酶主要调控的。对于茅苍术药效成分合成变化进行关键酶基因表达的研究,是明确茅苍术分子调控机制与控制其药材品质的重要方法。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 戴红君,程金花,虞德容,等. 中药茅苍术研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2016, 44(11): 26-28.
- [3] 吴佳新. 茅苍术挥发油成分及药理活性综述 [J]. 江苏农业科学, 2016, 44(3): 28-30.
- [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] 蒋玲,谷巍,巢建国,等. 濒危药用植物茅苍术法呢基焦磷酸合酶基因克隆及其表达分析 [J]. 中草药, 2017, 48(4): 760-766.
- [6] Bhambhani S, Lakhwani D, Shukla T, *et al.* Genes encoding members of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR) gene family from *Azadirachta indica* and correlation with azadirachtin biosynthesis [J]. *Acta Physiol Plant*, 2017, 39(2): 65.
- [7] Qian J, Liu Y, Chao N, *et al.* Positive selection and functional divergence of farnesyl pyrophosphate synthase genes in plants [J]. *BMC Molecular Biol*, 2017, 18(1): 3.
- [8] 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 Agrobot Cluj Napoca*, 2017, 45(2): 358-364.
- [9] 陈诚,林晨. 苏南地区耕地质量评价与分区保护研究 [J]. 长江流域资源与环境, 2016, 25(12): 1860-1869.
- [10] 赵胡,唐俊,郑文教. 重金属 Cu^{2+} 胁迫对红树植物秋茄幼苗生长及某些生理特性的影响 [J]. 海洋科学, 2016, 40(4): 65-72.
- [11] 桑晓华,谷巍,巢建国,等. 茅苍术内参基因筛选及其在活性成分生物合成研究中的应用 [J]. 植物生理学报, 2017, 53(9): 1680-1686.
- [12] 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.
- [13] 王黎,罗静,裴瑾,等. 橘核柠檬苦素类化合物积累与功能基因表达的灰色关联度分析 [J]. 中草药, 2017, 48(2): 345-350.
- [14] Moravcova S, Tuma J, Ducaiova Z K, *et al.* Influence of salicylic acid pretreatment on seeds germination and some defence mechanisms of *Zea mays* plants under copper stress [J]. *Plant Physiol Bioch*, 2018, 122: 19-30.
- [15] 贾鹏,王媛,陈涛,等. 苦荞 MT2 基因的克隆及其对铜胁迫的响应 [J]. 农业生物技术学报, 2017, 25(6): 874-883.
- [16] 王川,李昆伟,魏宇昆,等. Cu^{2+} 胁迫对丹参生长及有效成分积累的影响 [J]. 植物研究, 2012, 32(1): 124-128.
- [17] 魏麟,黎晓英,刘胜贵,等. 鱼腥草 HMGR 基因 cDNA 克隆、差异表达及蛋白质结构分析 [J]. 中草药, 2017, 48(18): 3815-3819.