

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2017.20260

蒋向辉, 余朝文, 苑静, 谭荣. 微量元素对金银花绿原酸合成关键酶基因 *LjHCT* 和 *LjC3H1* 表达的影响研究[J]. 植物科学学报, 2017, 35(2): 260-266Jiang XH, She CW, Yuan J, Tan R. Effects of trace elements on the expression of *LjHCT* and *LjC3H1* for chlorogenic acid synthesis in *Lonicera japonica* Thunb.[J]. *Plant Science Journal*, 2017, 35(2): 260-266

微量元素对金银花绿原酸合成关键酶基因 *LjHCT* 和 *LjC3H1* 表达的影响研究

蒋向辉^{1*}, 余朝文², 苑静¹, 谭荣¹

(1. 凯里学院化学与材料工程学院, 贵州凯里 556011; 2. 怀化学院生物与食品工程学院, 湖南怀化, 418008)

摘要: 绿原酸是金银花(*Lonicera japonica* Thunb.)入药的主要化学成分, 如何稳定和提高绿原酸的含量是近年来金银花研究的热点。本研究通过对金银花分别根施 Fe、B 和 Mo 3 种微量元素, 比较处理前、后金银花中微量元素与绿原酸含量的变化, 并定量分析 3 种微量元素对金银花绿原酸合成关键酶基因 *LjHCT* 和 *LjC3H1* 表达的影响。研究结果显示, 高浓度的 Fe 处理对 *LjHCT* 基因的表达有明显的抑制作用, 而中、低浓度的 Fe 处理可以促进 *LjHCT* 基因的表达; 随着 B 和 Mo 元素浓度的提高, *LjHCT* 基因的表达量也逐渐增加。低浓度的 Fe 处理可以促进 *LjC3H1* 基因的表达, 而高浓度的 Fe 处理对 *LjC3H1* 基因的表达具有抑制作用; B 元素对 *LjC3H1* 基因表达无显著影响, 而高浓度的 Mo 处理可以促进 *LjC3H1* 基因的表达。根施中、低浓度的 Fe 元素, 中、高浓度的 Mo 和 B 元素后金银花绿原酸含量显著增加; 而根施高浓度的 Fe 元素后金银花中绿原酸含量显著减少。研究结果表明微量元素 Fe、B 和 Mo 可通过调节绿原酸生物合成关键酶基因的表达从而有效促进绿原酸的形成和积累。本研究为人工定向调控金银花绿原酸含量、开发人工栽培金银花专用微量元素肥料提供了理论依据。

关键词: 金银花; 微量元素; 绿原酸; *LjHCT*; *LjC3H1*

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2017)02-0260-07

Effects of trace elements on the expression of *LjHCT* and *LjC3H1* for chlorogenic acid synthesis in *Lonicera japonica* Thunb.

Jiang Xiang-Hui^{1*}, She Chao-Wen², Yuan Jin¹, Tan Rong¹

(1. College of Chemistry and Materials Engineering, Kaili University, Kaili, Guizhou 556011, China;

2. Department Biological and Food, Huaihua University, Huaihua, Hunan 418008, China)

Abstract: Chlorogenic acid is the main chemical constituent of *Lonicera japonica* Thunb., and is responsible for various pharmacological activities. Therefore, increases in the chlorogenic acid content in *L. japonica* flowers is economically and medically important. This study aimed to characterize the effects of applying three micro-elements (Fe, B and Mo) on hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinic acid hydroxycinnamoyl transferase (*LjHCT*) and p-coumaroyl-shikimate 3'-hydroxylase (*LjC3H1*) genes in *L. japonica*. Results showed that high Fe concentration had an obvious inhibitory effect on *LjHCT* gene expression, whereas low and moderate concentrations promoted *LjHCT* gene expression. With the increase in B and Mo

收稿日期: 2016-08-01, 退修日期: 2016-10-12。

基金项目: 贵州省科技计划厅联合基金项目(黔科合 LH 字[2014]7219); 贵州省科学技术基金项目(黔科合 J 字[2015]2131); 贵州省教育厅重点项目(黔教合 KY 字[2014]281); 湖南省科技计划重点项目(2013FJ4324)。

This work was supported by grants from the Joint Funds Project of Guizhou Technological Department (LH [2014]7219), Project of Guizhou Technological Department (J[2015]2131), Educational Commission of Guizhou Province (KY[2014]281), and Project of Hunan Technological Department (2013FJ4324)。

作者简介: 蒋向辉(1974-), 男, 副教授, 博士, 研究方向主要为药用植物功能成分。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: jxfei789@163.com)。

concentrations, the expression of *LjHCT* also increased significantly. Low Fe concentration promoted *LjC3H1* gene expression, whereas high Fe concentration exhibited an inhibitory effect. The effect of B on *LjC3H1* expression was not obvious, but high Mo concentration promoted *LjC3H1* gene expression. These results showed that chlorogenic acid biosynthesis and accumulation increased with increasing *LjHCT* and *LjC3H1* expressions, which were two key enzymes in the synthesis of chlorogenic acid, and Fe, B and Mo concentrations had significant effects on *LjHCT* and *LjC3H1* expression. Application of moderate or low concentrations of Fe, high or moderate concentrations of Mo, and high or moderate concentrations of B significantly increased the accumulation of chlorogenic acid in *L. japonica* flowers; however, the application of high concentrations of Fe significantly decreased accumulation. This study provides research-based data for improving the cultivation of *L. japonica* by increasing the use of trace element fertilizer.

Key words: *Lonicera japonica* Thunb.; Trace elements; Chlorogenic acid; *LjHCT*; *LjC3H1*

金银花(*Lonicera japonica* Thunb.)又名忍冬,是忍冬科(Caprifoliaceae)忍冬属药用植物^[1],以花入药,药用价值较高,具有广谱抗菌和散风消肿的功效,常用于治疗痈肿疔疮、丹毒和血痢等病症^[2]。目前,有关金银花的研究主要集中在化学成分分析、药用价值利用等方面^[3,4]。绿原酸是金银花主要的抗菌、抗病毒药理成分,而环境因子可直接影响金银花主要药用成分合成相关基因的表达与调控^[5]。*LjHCT*和*LjC3H1*基因是金银花绿原酸合成途径中重要的关键酶基因,绿原酸含量与该基因的表达量呈明显的正相关^[6]。

近年来,微量元素对植物功能基因表达的调控作用日益受到关注。研究发现,微量元素不仅是植物体必不可少的营养物质,而且还可参与功能基因的表达与调控^[7],例如Fe、Zn、Mo、Cu、Mn等二价金属元素能引发蛋白与核酸结合。可以通过微量元素摄入量的改变影响金属元素效应元件与结合蛋白的反应,从而起到影响基因转录或转录后调控的作用。金属元素对基因表达的调控与细胞内相应元素的含量紧密相关^[8]。梁新华^[9]研究发现,Zn、Mo和Mn3种微量元素对甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch)中甘草酸的形成与积累具有明显促进作用,较高浓度的Zn和中高浓度的Mo能促进甘草中黄酮合成酶(SQS)基因的表达;不同浓度的Zn均可明显提高 β -香树脂醇合成酶(β -AS)基因的表达。植物体对各种微量元素的吸收存在相互抑制或促进的作用。在药用植物活性成分的合成和积累过程中,不同类型的微量元素所起的作用及作用程度也不同,各元素的含量、形态,元素间的平衡与

互作,以及元素与其他环境因子间的互作等均可对药用植物活性成分的合成和积累产生重要影响^[10]。

微量元素是金银花生长必需的金属元素,适当施加微量元素也是提高金银花有机酸含量的有效方法。本研究通过在实验地土壤中施加Fe、B和Mo3种微量元素,探讨它们对金银花绿原酸合成相关基因*LjHCT*和*LjC3H1*表达的影响,旨在从土壤和矿质营养的角度阐明其对金银花绿原酸合成的影响机制并科学指导道地药材的规范化栽培提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

金银花于2009年引自山东省平邑县,经怀化学院刘光华教授鉴定后种植于凯里学院实验基地。选取长势基本一致、株高约0.8~1.0m、展幅为0.6~0.8m的植株为实验材料。实验地为黄壤土,年平均气温在16℃~18℃之间,年平均降水量1100~1300mm。对栽培的实验材料进行常规管理。

1.2 仪器和试剂

UV-240紫外分光光度计(日本岛津);日立Z-8000型原子吸收光谱仪(日立);Optima 5300DV热电电感耦合等离子体原子发射光谱仪(美国Pekin-Elmer);MX3000P型荧光定量PCR仪(美国STRATEGENE);Waters2695高效液相色谱仪;PDA紫外检测器;Waters Symmetry C18色谱柱(4.6mm×250mm×5μm);Fe、B和Mo3种元素空心阴极灯(日立);MAR SXpress微波消解

系统(美国 CEM)。

浓硝酸、高氯酸均为优级纯,其他试剂为分析纯;绿原酸标准品、Fe、B 和 Mo 元素的标准溶液浓度为 100 mg/L; Trizol (Invitrogen); dNTPs、LA Taq、M-MLV 逆转录酶、DnaseI、Oligo(dT)₁₈、SYBR Premix 和 RNaseA 抑制剂等购自 MBI 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 田间实验设计与微量元素的施加

2014 年 4 月 2 日选取人工种植 3 年、长势基本一致的金银花植株,按照随机区组设计,每小区 3 株,设 3 次重复,共设置 27 个小区,81 株。间隔每株植物根部 30 cm 处开一直径 1 m、深 10 cm 的浅沟,按照微量元素施用浓度(表 1,采用 FeSO₄、Na₂B₄O₇ · 10H₂O 和 Na₂MoO₄ 3 种盐),以每株面积 1 m²计算施用量,参照相关标准进行穴播^[11]。分别于 2014 年 4 – 8 月的 2 号施肥,共施 5 次,植株进行常规人工管理。

表 1 3 种微量元素施用浓度

Table 1 Fertilizer concentration of three trace elements

Elements	高浓度 High concentration (kg/hm ²)	中浓度 Middle concentration (kg/hm ²)	低浓度 Low concentration (kg/hm ²)
Fe	8.0	4.0	2.0
B	4.5	3.0	1.5
Mo	0.3	0.2	0.1

1.3.2 样品采集与处理

2014 年 3 月 27 日(未施肥)采集金银花根部土样置于实验室风干,过 40 目筛,用于测定土壤中各营养元素含量。2014 年 9 月 15 日采集金银花白花,于 105℃烘箱内杀青 30 min,然后在 60℃下烘干至恒重,粉碎后过 80 目筛,保存备用。

1.3.3 营养元素含量测定

土壤和金银花中 B、Mo 含量的测定参照劳家桎^[12]的方法;Fe、Mn、Zn 含量的测定参照蒋向辉等^[13]的火焰原子吸收光谱法(FAAS)。土壤中有机质含量测定采用重铬酸钾容量法;N、P、K、Ca、Mg、Na 等元素的测定参照聂西度等^[14]的电感耦合等离子体原子发射光谱法(ICP-OES)。

1.3.4 金银花绿原酸含量的测定

绿原酸含量测定采用高效液相色谱法(HPLC)^[6],色谱检测条件如下:反相 C18 柱

(5 μm, 250 mm × 4.6 mm);流动相:甲醇/0.5% 冰醋酸(30 : 70);流速:1.0 mL/min;进样量:20 μL;柱温:30℃。

1.3.5 LjHCT 和 LjC3H1 基因的表达分析

2014 年 9 月 15 日采集金银花白花,提取总 RNA,并合成 cDNA 第一链,参照蒋向辉^[6]的方法设计引物进行荧光定量 PCR 分析。

1.3.6 数据统计与分析

采用 SPSS 16.0 软件对实验数据进行方差分析与多重比较。方差分析过程中首先对实验数据进行单因素分析,若具有显著差异,再进行 LSD 多重比较。

2 结果与分析

2.1 实验地营养元素含量的测定

实验地土壤为黄壤土(pH 7.65,有机质含量为 90.20 g/kg;全氮 0.25 g/kg,全磷 1.82 g/kg,全钾 10.64 g/kg,全钙 0.64 g/kg,全钠 6.53 g/kg,全镁 3.97 g/kg,有效磷 32.00 mg/kg,有效锰 86.00 mg/kg,有效锌 3.22 mg/kg,有效硼 0.87 mg/kg,有效铁 11.41 mg/kg,有效钼 0.05 mg/kg)。根据郑鹤龄^[15]有关土壤微量元素的丰缺指标及参数分析发现,实验地土壤中全钠、全磷、有效锰和锌含量偏高,全钾和有效磷含量处于平均水平;有效铁、硼、钼相对缺乏。

2.2 3 种微量元素对 LjHCT 与 LjC3H1 基因表达的影响

2.2.1 3 种微量元素对 LjHCT 基因表达的影响

金银花在不同浓度微量元素的处理下,LjHCT 基因的表达量不同(图 1)。高浓度 Fe 处理对 LjHCT 基因的表达有明显抑制作用,而低浓度 Fe 处理可以促进该基因的表达,中浓度 Fe 处理时基因的表达量达到最大值。随着 B 和 Mo 元素处理浓度的提高(低、中、高),LjHCT 基因的表达量均有明显增加,其中 B 元素处理后表达量分别为对照组的 2.33、3.09 和 3.61 倍;Mo 元素处理后表达量为对照组的 1.59、2.52 和 3.39 倍。研究结果表明,在适当的浓度下,外施 B 和 Mo 元素可有效促进金银花对土壤中 B、Mo 元素的吸收与利用。

2.2.2 3种微量元素对 *LjC3H1* 基因表达的影响

研究发现，低浓度的 Fe 处理可以促进金银花 *LjC3H1* 基因的表达，表达量是对照的 2.07 倍，而高浓度 Fe 处理对 *LjC3H1* 基因的表达有一定的抑制作用，但差异未达显著水平(图 2)。各浓度 B 元素处理后，*LjC3H1* 基因表达量与对照无显著差异。与对照相比，各浓度的 Mo 元素处理后均可促进 *LjC3H1* 基因的表达，但在中浓度条件下，*LjC3H1* 基因表达量均比低和高浓度处理的低，表明不同浓度的 Mo 元素对绿原酸生物合成有较大的影响。

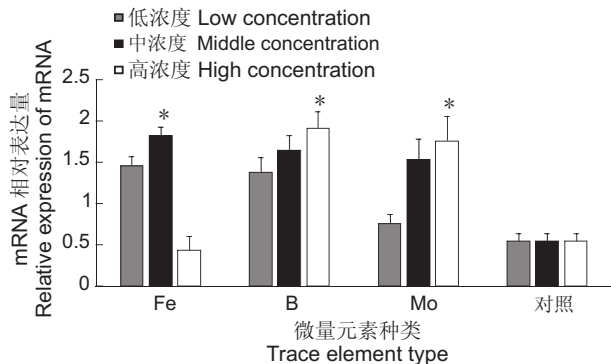
2.3 施加3种微量元素后对金银花中微量元素的影响

2.3.1 对金银花中 Fe 元素含量的影响

根施不同浓度的 Fe 元素后，金银花中 Fe 元素含量明显增多(图 3)，与对照相比，差异均达到显著水平($P < 0.05$)。不同浓度的 B 和 Mo 元素处理后，金银花中 Fe 元素含量均减少，高浓度 B 和 Mo 处理效果较为明显，分别比对照 Fe 元素含量减少 24.46%和 17.93%。

2.3.2 对金银花中 B 元素含量的影响

根施 B 和 Mo 元素可以有效促进金银花中 B 元素的积累，其中以高浓度 B 和 Mo 处理时效果较好(图 4)，与对照相比差异均达到显著水平，分别比对照增加 27.56% 和 13.39%。土壤中施加不同浓度的 Fe 元素后，金银花中 B 元素均有所减少，中浓度 Fe 处理后效果较明显，比对照减少 13.78%。实验结果表明，施加 B 和 Mo 元素对金



* 表示同等级浓度不同元素处理后差异达到显著水平 ($P < 0.05$)，下同。
* shows significant difference at 0.05 after treatment with the same concentrations of different elements, same below.

图1 施加不同微量元素后 *LjHCT* 基因的表达量
Fig. 1 Relative expression of *LjHCT* in *L. japonica* after application of different trace elements

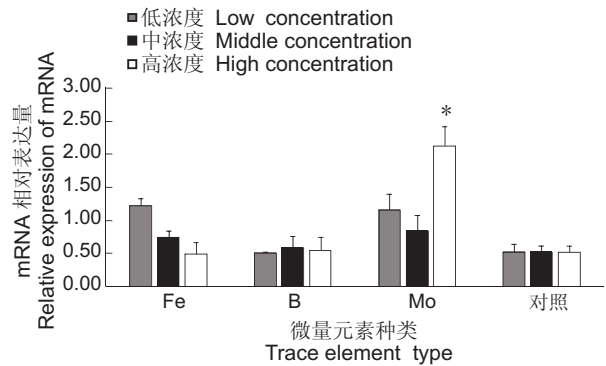


图2 施加不同微量元素后 *LjC3H1* 基因表达量
Fig. 2 Relative expression of *LjC3H1* in *L. japonica* after application of different trace elements

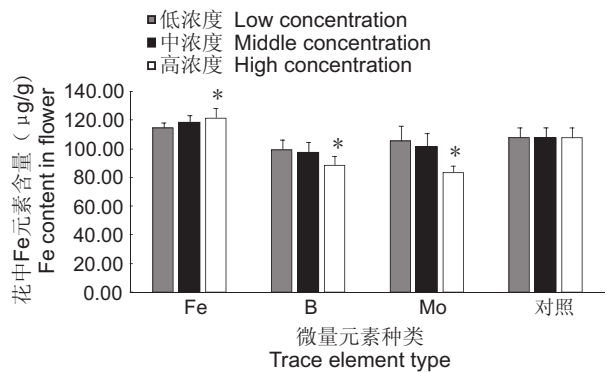


图3 根施不同微量元素后金银花中 Fe 元素含量变化
Fig. 3 Changes in Fe content in *L. japonica* after application of different trace elements

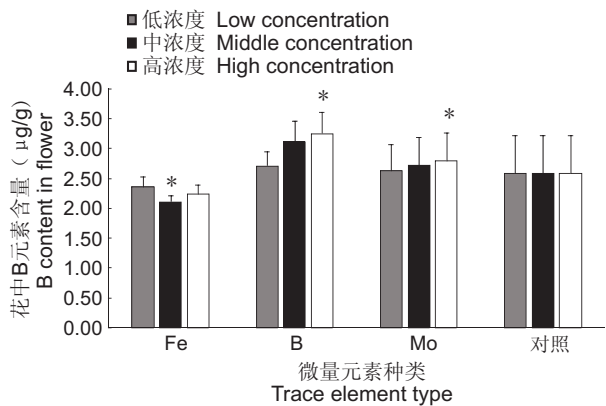


图4 根施不同微量元素后金银花中 B 元素含量变化
Fig. 4 Changes in B content in *L. japonica* after application of different trace elements

银花中 B 元素的积累具有促进作用。

2.3.3 对金银花中 Mo 元素含量的影响

根施 Mo 和 B 元素后，金银花中 Mo 元素含量明显增加，其中高浓度的 Mo、B 和中浓度的 Fe 作用较明显(图 5)，与对照相比差异均达到显著水平，分别比对照增加 25.94%、19.58%和 13.68%。

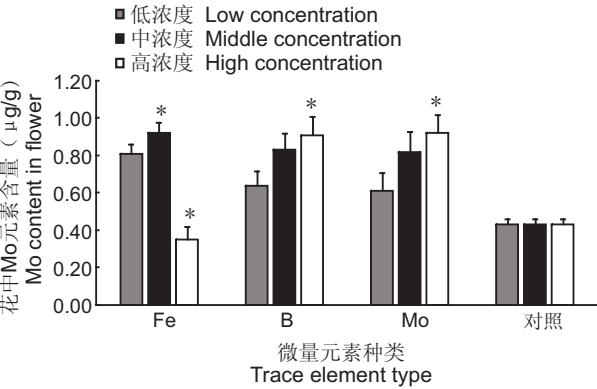


图 5 根施不同微量元素后金银花中 Mo 元素含量变化
Fig. 5 Changes in Mo content in *L. japonica* after application of different trace elements

但高浓度的 Fe 元素处理后金银花中 Mo 元素含量比对照显著减少。实验结果表明，在适宜的浓度下，根施 Fe、B 和 Mo 元素均可有效促进金银花对土壤中 Mo 元素的吸收和积累。

2.4 不同微量元素处理后对金银花绿原酸含量的影响

根施中、低浓度的 Fe 元素后，金银花植株叶片浓绿、生长旺盛，绿原酸含量与对照相比显著增加。而施加高浓度的 Fe 元素后，金银花出现中毒现象，花苞不开放或开放后花丝凋谢枯萎，叶尖出现褐斑，叶色暗绿，绿原酸含量显著减少。根施不同浓度的 B 元素后，绿原酸含量明显增加，中、高浓度处理后差异达到显著性水平。不同浓度的 Mo 元素处理后，绿原酸含量也增加明显，特别是高浓度 Mo 元素处理后差异达到显著水平 ($P < 0.05$)，中浓度处理时达到显著水平，而低浓度处理后，差异不显著(图 6)。

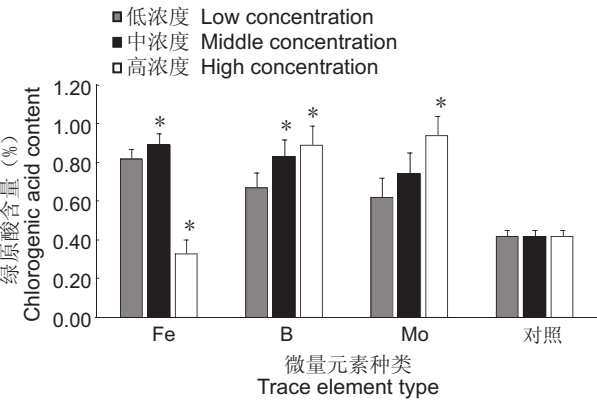


图 6 不同微量元素处理后金银花中绿原酸含量
Fig. 6 Chlorogenic acid content in *L. japonica* after application of different trace elements

3 讨论

3.1 根施微量元素对金银花中微量元素和绿原酸含量的影响

本研究在根施 Fe、B、Mo 元素后测定金银花中相应的微量元素及绿原酸含量，结果显示，根施不同种类的微量元素对金银花中微量元素及绿原酸含量影响比较明显，且不同浓度处理下的效果也不相同。中、低浓度的 Fe，3 种浓度的 B 和高浓度的 Mo 元素均可有效促进绿原酸的积累。根施 Fe、B、Mo 元素可有效增加金银花对这 3 种元素的吸收和积累，且金银花对 Fe 元素的吸收与对 B 和 Mo 元素的吸收具有拮抗作用，而金银花中 Mo 和 B 元素的吸收和积累具有协同作用。

3.2 根施微量元素与 *LjHCT*、*LjC3H1* 基因表达量的关系

根施 Fe、B、Mo 元素后分析 *LjHCT* 和 *LjC3H1* 基因的表达量发现，低浓度的 Fe、3 种浓度的 B 和 Mo 元素处理均可提高 *LjHCT* 基因的表达量，但高浓度的 Fe 处理对 *LjHCT* 和 *LjC3H1* 基因的表达具有明显的抑制作用；B 和 Mo 处理下 *LjHCT* 基因的表达量高于同等条件下 *LjC3H1* 基因的表达量。B 元素对 *LjC3H1* 基因的表达量与对照相比无显著差异。随着 Mo 元素处理浓度的增加，*LjC3H1* 基因的表达量呈现出先下降、后上升的趋势。此外，低浓度的 Fe 处理对 *LjC3H1* 基因的表达也有明显促进作用。研究结果显示，随着 3 种元素含量的增加，*LjHCT* 与 *LjC3H1* 基因的表达量增加，绿原酸含量也相应增多。表明金银花中 Fe、B、Mo 3 种微量元素对 *LjHCT* 和 *LjC3H1* 基因的表达起重要的调控作用，而金银花中 Fe、B、Mo 的含量可通过根施的方法予以调节。

3.3 微量元素在植物绿原酸合成中的表达机制

Campa 等^[16] 认为咖啡 (*Coffea liberica* Bull ex Hiern) 中的绿原酸主要有 2 条合成途径，即莽草酸途径和咖啡酸途径。在绿原酸合成中涉及到的酶有苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、肉桂酸-4-羟化酶 (C4H)、4-羟基桂皮酰辅酶 A 连接酶 (4CL)、羟甲基化肉桂酰辅酶 A / 奎宁酸羟化肉桂酰基转移酶 (CQT)、香豆酸羟甲基化酶 (C3H) 以及羟基肉桂酰辅酶 A 莽草酸/奎宁酸羟基肉桂酰转移酶 (HCT)，绿原酸合成量的多少与这些酶的活性和功能紧密相

关。何柳等^[17]研究认为绿原酸是由苯丙氨酸经莽草酸途径合成的。Camacho-Cristobal 等^[18]研究证实烟草(*Nicotiana tabacum* L.)缺B元素时会影响植株体内PAL的活性,进而影响绿原酸的含量。

本研究结果显示,高浓度的B对*LjHCT*基因的表达具有明显的促进作用,而对*LjC3H1*基因的表达无明显影响,这可能与*LjHCT*和*LjC3H1*酶通过不同途径调控绿原酸的合成有关。刘丽娟等^[19]研究返魂草(*Senecio cannabifolius* Less.)营养元素与绿原酸含量变化规律时发现,绿原酸的合成以营养物质的合成为基础,营养元素在绿原酸的合成与积累中起重要作用。苏建荣等^[20]研究发现,可通过调节元宝槭(*Acer truncatum* Bunge)叶片内营养元素的含量影响绿原酸含量。Karki等^[21]研究认为,微量元素是植物代谢相关酶必需的组分或激活因子,微量元素摄入量的改变直接影响金属元素效应元件与结合蛋白的反应效率,从而实现了对基因转录或转录后的调控作用^[21]。本研究也发现,Fe、B、Mo对*LjHCT*和*LjC3H1*基因的表达具有一定的影响。郭雷等^[22]有关微量元素对基因表达调控途径的研究结果表明,Fe元素通常直接与转录因子结合,从而激活基因的转录;钼酶是与基因表达紧密相关的酶,而Mo是钼酶的必需元素。有关B元素参与基因表达调控的研究尚未见报道,金银花中B元素可能是通过加强光合作用、同化物质运输等重要生理机能促进绿原酸的积累,但研究结果有待进一步证实。

研究表明,微量元素可以通过多种途径调节植物特定基因的表达,从而影响植物体的代谢过程,最终影响代谢产物的含量^[23,24]。本研究结果表明,微量元素Fe、B、Mo浓度的改变可导致绿原酸生物合成关键酶基因的表达发生相应变化,最终影响绿原酸的形成和积累。因此,通过基因表达分析,研究微量元素对金银花绿原酸合成的作用机制,配合相应的生理生化研究,可为全面解析微量元素对绿原酸合成相关酶活性的调控机制提供参考。

参考文献:

- [1] Lu HX, Zhang L, Huang H. Study on the isolation of active constituents in *Lonicera japonica* and the mechanism of their anti-upper respiratory tract infection action in children [J]. *Afr Health Sci*, 2015, 15(4): 1295–1301.
- [2] Wu J, Wang XC, Liu Y, Du H, Shu QY, Su S, Wang LJ,

Li SS, Wang LS. Flavone synthases from *Lonicera japonica* and *L. macranthoides* reveal differential flavone accumulation[J]. *Sci Rep*, 2016, 10(6): 1–14.

- [3] Lieurance D, Cipollini D. Environmental influences on growth and defence responses of the invasive shrub, *Lonicera maackii*, to simulated and real herbivory in the juvenile stage[J]. *Ann Bot*, 2013, 112(4): 741–749.
- [4] 姜南辉. 金银花化学成分研究[J]. *中药材*, 2015, 38(2): 315–316.
- Jiang NH. Study on chemical constituents of *Lonicera japonica* bud[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2015, 38(2): 315–316.
- [5] Liu ZX, Cheng ZY, He QJ, Lin B, Gao PY, Li LZ, Liu QB, Song SJ. Secondary metabolites from the flower buds of *Lonicera japonica* and their *in vitro* anti-diabetic activities[J]. *Fitoterapia*, 2016, 110: 44–51.
- [6] 蒋向辉. 金银花绿原酸合成途径关键酶基因克隆与功能分析[D]. 长沙: 湖南大学, 2013.
- Jiang XH. Cloning and function analysis of chlorogenic acids biosynthetic pathway key genes from *Lonicera japonica* Thunb. [D]. Changsha: Hunan university, 2013.
- [7] 李津婴. 必需微量金属元素在基因表达中的调控作用[J]. *国外医学卫生学分册*, 1996, 23(2): 270–274.
- Li JY. Necessary trace metal elements in regulation of gene expression [J]. *Foreign Medical Sciences (Section of Hygiene)*, 1996, 23(2): 270–274.
- [8] Lane DJ, Chikhani S, Richardson V, Richardson DR. Transferrin iron uptake is stimulated by ascorbate via an intracellular reductive mechanism[J]. *BBA Mol Cell Res*, 2013, 1833(6): 1527–1541.
- [9] 梁新华. 微量元素对甘草中甘草酸形成与积累影响的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2010.
- Liang XH. Effect of micro-elements on biosynthesis and accumulation of glycyrrhizic acid in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch[D]. Beijing: Beijing forestry university, 2010.
- [10] 李琰, 崔蕾, 雷嘉敏, 李群, 张兴. 不同浓度有机物对雷公藤不定根生长和次生代谢产物含量的影响[J]. *植物科学学报*, 2014, 32(2): 174–180.
- Li Y, Cui L, Lei JM, Li Q, Zhang X. Effects of different concentrations of organic affixture on the growth and secondary metabolites contents in adventitious roots of *Tripterygium wilfordii* [J]. *Plant Science Journal*, 2014, 32(2): 174–180.
- [11] 莫尔维德特. 农业中的微量营养元素[M]. 北京: 农业出版社, 1984.
- Mortvedt. Trace Nutrient Elements in Agriculture[M]. Beijing: Agriculture Press, 1984.
- [12] 劳家桎. 土壤农化分析手册[M]. 北京: 农业出版社, 1998.
- Lao JC. Analysis for Soil Agro-chemistry Manual[M]. Beijing: Agriculture Press, 1998.

- [13] 蒋向辉, 苑静, 祝军委, 胡秀虹, 杨承慧. 青钱柳叶片矿质营养元素含量季节动态变化研究[J]. 浙江林业科技, 2015, 35(2): 17-21.
Jiang XH, Yuan J, Zhu JW, Hu XH, Yang CH. Seasonal variation of mineral nutrient contents in *Cyclocarya paliurus* leaves[J]. *Journal Of Zhejiang for Science & Technology*, 2015, 35(2): 17-21.
- [14] 聂西度, 符靛. 盐酸浸提-电感耦合等离子体发射光谱法测定秋葵中 Na、Mg、P、K、Ca 含量[J]. 食品科学, 2015, 36(24): 101-104.
Nie XD, Fu L. Determination of macro elements in okra by inductively coupled plasma optical emission spectrometry with hydrochloric acid extraction[J]. *Food Science*, 2015, 36(24): 101-104.
- [15] 郑鹤龄. 微量元素营养诊断[M]. 天津: 天津科技翻译出版社, 2010.
Zheng HL. Trace Elements Nutrition Diagnosis[M]. Tianjin: Tianjin Science and Technology Translation Publishing Press, 2010.
- [16] Campa C, Noirot M, Bourgeois M, Pervent M, Ky CL, Chrestin H, Hamon S, Kochko AD. Genetic mapping of a caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase gene in coffee trees. Impact on chlorogenic acid content[J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107(4): 751-756.
- [17] 何柳, 陈士林. 植物中绿原酸合成途径研究进展[J]. 药物生物技术, 2013, 20(5): 463-466.
He L, Chen SL. Research progresses on synthesis of chlorogenic acid in plants[J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2013, 20(5): 463-466.
- [18] Camacho-Cristóbal JJ, Lunar L, Lafont F, Baumert A, González-Fontes A. Boron deficiency causes accumulation of chlorogenic acid and caffeoyl polyamine conjugates in tobacco leaves[J]. *J Plant Physiol*, 2004, 161(7): 879-881.
- [19] 刘丽娟, 张卫东, 秦佳梅, 徐鸿雁, 王育民. 返魂草营养元素与绿原酸含量变化规律研究[J]. 河南农业科学, 2010, 10(2): 89-91.
Liu LJ, Zhang WD, Qin JM, Xu HY, Wang YM. Changes of nutrient elements and chlorogenic acid content in *Senecio cannabifolius* Less. [J]. *Henan Agricultural Science*, 2010, 10(2): 89-91.
- [20] 苏建荣, 邓疆, 罗香, 杨文云. 元宝槭幼树施肥研究 I. 不同施肥处理对生长与构型的影响[J]. 林业科学研究, 2005, 18(2): 147-152.
Su JR, Deng J, Luo X, Yang WY. Studies on fertilization of young *Acer truncatum* Bunge I. Effect of various nutrition supply conditions on growth and morphology of *Acer truncatum* Bunge [J]. *Forest Research*, 2005, 18(2): 147-152.
- [21] Karki P, Kim C, Smith K, Son DS, Aschner M, Lee E. Transcriptional regulation of the astrocytic excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1) via NF- κ B and Yin Yang 1 (YY1)[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(39): 23725-23737.
- [22] 郭雷, 胡洪, 任列娇, 高士争. 蛋白质翻译起始因子的作用与调控[J]. 云南农业大学学报, 2011, 26(4): 554-559.
Guo L, Hu H, Ren LJ, Gao SZ. Function and regulation of protein translation initiation factors[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2011, 26(4): 554-559.
- [23] 梁新华, 梁维江, 梁军, 张凤侠. 硼等 4 种元素对甘草酸生物合成关键酶基因表达的 RT-PCR 分析[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(2): 2351-2353.
Liang XH, Luan WJ, Liang J, Zhang FX. RT-PCR analysis on the differential expression of the key enzyme genes involved in glycyrrhizic acid synthetic metabolic pathway under B, Mn, Zn and Mo elements treatment[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2011, 22(2): 2351-2353.
- [24] 陈雅彬, 李永强, 孙琳, 沈妍雯, 陈文荣, 刘霞, 郭卫东. 非酸性根际土壤对蓝莓铁元素吸收及其代谢相关基因表达的影响[J]. 园艺学报, 2015, 42(2): 233-242.
Chen YB, Li YQ, Sun L, Shen YW, Chen WR, Liu X, Guo WD. Effects of non-acid rhizosphere pH on the iron elements uptakes and expressions of iron metabolism related genes in blueberry[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2015, 42(2): 233-242.

(责任编辑: 周 媛)