

杜仲橡胶合成相关酶基因 *HMGR* 的克隆与表达分析

荆 腾, 王 淋, 乌云塔娜, 杜红岩

(中国林业科学研究院经济林研究开发中心/国家林业局杜仲工程技术研究中心, 郑州 450003)

摘要:为解析 *HMGR* 基因在杜仲橡胶生物合成中的作用, 本研究以杜仲良种华仲 6 号叶片和果皮为材料, 参考杜仲基因组和转录组数据, 克隆了杜仲 *HMGR* 基因, 命名为 *EuHMGR*, 全长 1770 bp, 编码 590 个氨基酸。实时荧光定量 PCR 测定结果显示, *EuHMGR* 基因在果皮中的表达量于 5 月中旬达到最大值, 而在叶片中的最大值出现在 7 月中旬。通过索氏提取测定相应时期果皮和叶片的含胶量表明, 果皮中的含胶量从 4 月中旬到 5 月下旬迅速增加, 而叶片中的含胶量一直平稳增长。分析不同发育时期果皮和叶片 *EuHMGR* 基因表达量和含胶增长速率相关性发现, 果皮 *EuHMGR* 基因在不同发育时期的相对表达量和含胶增长速率呈显著正相关, 而二者在叶片中无明显相关性。因此, 推测 *EuHMGR* 基因的表达与杜仲果皮中橡胶生物合成相关。

关键词: 杜仲; 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶; 基因表达; 杜仲橡胶

Cloning and Expression Analysis of *HMGR* Involved in Rubber Biosynthesis of *Eucommia ulmoides* Oliv.

JING Teng, WANG Lin, WUYUN Ta-na, DU Hong-yan

(Non-timber Forest Research and Development Center of Chinese Academy of Forestry, The *Eucommia* Engineering Research Center of State Forestry Administration, Zhengzhou 450003)

Abstract: In order to investigate the characteristic of *HMGR* gene associated with the rubber biosynthesis in *Eucommia ulmoides* Oliv., based on sequences of *Eucommia ulmoides* Oliv. genome and transcriptome data, a 1770bp full-length cDNA encoding 590 amino acid residues, named as *EuHMGR*, was cloned by using leaves and pericarp of Huazhong No. 6 as the template, respectively. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) experiments showed that *EuHMGR* mRNA accumulation in pericarp was the highest in mid-May, nevertheless, that in leaves was in the middle of July. Moreover, the content of rubber in leaves and pericarp was determined by Soxhlet extraction at each corresponding time point. The result showed that the content of rubber increased rapidly in pericarp from mid-April to late-May compared with the steady growth in leaves in all tested time points. Besides, the correlation analysis suggested that there was a significant correlation between *EuHMGR* expression patterns and accumulation rate of *Eu*-Rubber in leaves and pericarps at different developmental stages, and that not in leaves, which speculated that the expression of *EuHMGR* was related with the biosynthesis of rubber.

Key words: *Eucommia ulmoides* Oliv.; 3-hydro-3-methylglutary CoA reductase; gene expression; *Eucommia ulmoides* Oliv.

橡胶是我国重要的战略物质资源, 橡胶工业是我国国民经济最重要的基础产业之一。目前, 我国是世界上最大的橡胶消费国, 但由于主要胶源树种——三叶橡胶在我国适生范围狭窄, 产能已达极限, 致使我国天然橡胶的对外依赖度高达 80% 以上^[1], 已远超出国家战略安全警戒线 (66.7%)。杜仲 (*Eucommia*

ulmoides Oliv.) 被列为中药上品已有 2000 多年的历史, 除了作为传统的中药以外, 杜仲果皮、叶片、树皮、根部均含白色丝状物质——杜仲橡胶。杜仲橡胶是优质的天然橡胶资源, 具有独特的结构与性能, 可以开发出各种不同用途的新型工业材料。杜仲适生范围广, 可在我国 27 个省 (区、市) 栽培, 是国际上公认

收稿日期: 2015-08-19 修回日期: 2015-09-27 网络出版日期: 2016-06-08

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20160608.1431.016.html>

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划 (2012BAD21B0502); 国家公益性行业科研专项 (201004029)

第一作者研究方向为杜仲育种研究。E-mail: jingt315@163.com

通信作者: 杜红岩, 主要从事杜仲育种、栽培与综合利用的研究。E-mail: dhy515@126.com

的能够替代传统三叶橡胶的树种,是极具发展潜力的优质天然胶资源^[1]。但由于目前提取杜仲橡胶的原材料——杜仲叶片和果皮含胶量低,导致生产成本居高不下,成为了杜仲胶产业化发展的瓶颈。

揭示杜仲橡胶生物合成过程中的基因调控机理有助于寻找提高杜仲橡胶产量的方法。早在 1892 年,法国人 Ernest 就发现了杜仲橡胶的化学成分是萜类反式聚异戊二烯^[2]。直到半个世纪之后, F. Lynen 等^[3]和 S. Chaykin 等^[4]提出萜类合成是由位于细胞质的甲羟戊酸(MVA, mevalonate)途径完成, A. Dulilio 等^[5]和 R. Michel^[6]分别独立提出萜类物质合成的另一条 MEP(MEP, 2-methyl-D-erythritol-4-phosphate)途径。日本学者采用同位素标定法标记 MVA 和 MEP 途径代谢中间产物,并跟踪观测,发现杜仲胶生物合成与 2 条萜类合成途径 MVA 和 MEP 均有关系,验证了杜仲胶是反式聚异戊二烯的观点^[7]。3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGR, 3-hydro-3-methylglutaryl CoA reductase)是甲羟戊酸(MVA)途径中的关键酶之一^[8]。*HMGR* 基因参与调控植物生长发育等多个方面,在植物萜类的生物合成中具有重要的调控作用,且在不同发育时期以及环境条件下,不同 *HMGR* 基因的表达具有差异性,最终导致合成的类异戊二烯终产物也不相同^[9]。目前,已经从多种高等植物中克隆出 *HMGR* 基因,其中包括铁皮石斛、甘草、橡胶草等^[10-17]。虽然 *HMGR* 基因在其他植物中已有相关报道,但杜仲 *HMGR* 基因与杜仲橡胶合成的关系尚不明确。

本研究根据杜仲基因组和转录组数据,通过 RT-PCR 技术成功克隆了杜仲 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶基因(*EuHMGR*),并采用荧光定量 PCR 方法检测杜仲果皮和叶片橡胶合成时期 *EuHMGR* 基因的表达动态变化,结合杜仲果皮和叶片含胶增长速率变化趋势,探寻该基因在杜仲果皮和叶片橡胶合成中的作用,为进一步研究 *EuHMGR* 基因在杜仲橡胶生物合成途径中的功能以及杜仲分子育种研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 本研究所用样品均采自中国林业科学研究院泡桐研究开发中心杜仲良种华仲 6 号。基因的表达模式分析以及橡胶含量测定所需的杜仲果皮和叶片分别于 2014 年 4 月至 8 月(4.1、4.15、4.30、5.15、5.30、6.14、6.29、7.14、7.29、8.13、8.28)每 15d 采集 1 次样品,样品采集后用液氮研磨, -80℃ 保存

备用。

1.1.2 试剂 植物 RNA 提取试剂盒(RNeasy Plant mini Kit)购自 QIAGEN 公司;cDNA 第 1 链合成 SuperScript™III First-Strand Synthesis System 购自 Invitrogen 公司;大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞和 DNA Marker 购自天根生化科技有限公司;PCR 相关试剂、凝胶回收试剂盒以及克隆载体 pMD-18T Vector 均购自 TaKaRa 公司;其他常规试剂为国产分析纯以上级别;引物合成及测序均由北京美吉生物有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 杜仲总 RNA 的提取及 cDNA 第 1 链合成 采用 QIAGEN 公司的 RNA 提取试剂盒(RNeasy Plant mini Kit)提取杜仲样品总 RNA,按照 Invitrogen 公司的 SuperScript™III First-Strand Synthesis System 反转录试剂盒说明书进行 cDNA 第 1 链的合成。

1.2.2 *EuHMGR* 基因全长 cDNA 的克隆与分析

通过对杜仲进行转录组及全基因组测序,在测序数据的基础上,利用 Primer Premier 5.0 设计杜仲 *HMGR* 基因特异性扩增引物:*EuHMGR*-F1: 5'-ATG-GATCTCCGCCGAGACC-3' 和 *EuHMGR*-R1: 5'-GGAAGAGGTAACCTTTGCTGA-3'。以杜仲第 1 链 cDNA 为模板,扩增程序为:94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 2 min, 35 个循环;72℃ 延伸 10 min。扩增产物经电泳检测,回收、纯化、连接至 pMD18-T 载体,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞后,挑取阳性克隆递交公司测序。

利用 NCBI 的 ORF finder 工具查找序列的开放阅读框;采用 ExPASy 的 ProtParam 工具对蛋白质的分子量和等电点进行预测,并通过 NCBI 的 BLAST 工具与 GenBank 中的已知序列比较,进行蛋白序列的相似性分析。

1.2.3 *EuHMGR* 基因的实时荧光定量 PCR 表达分析

根据获得的 *EuHMGR* 基因的全长序列,设计荧光定量 PCR 特异引物,扩增引物:*EuHMGR*-F2: 5'-CGCTCCCTCTATTTCTGACG-3' 和 *EuHMGR*-R2: 5'-ACGGAAGTGTCCCTGAAATG-3';以 *Actin* 作为内参,引物序列为 *act*-F: 5'-GTGACAATGGAAGTGAATGG-3' 和 *act*-R: 5'-AGACGGAGGATAGCGTGAGG-3'。反应在 ABI7500 实时定量 PCR 上进行,方法按照 TaKaRa 公司的 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒说明书进行操作,加入反应体系如下:SYBR Premix Ex Taq(2 $\times$)10.0 μ L, ROX Reference Dye II (50 $\times$)0.4 μ L, 特异引物 0.8 μ L, cDNA 第 1 链模板

(20 ng/ μ L) 2.0 μ L, 用 ddH₂O 补足 20 μ L。PCR 的扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 复性 34 s, 共 40 个循环, 同时对 Real-time PCR 产物进行 SYBR 溶解曲线分析。

1.2.4 杜仲橡胶含量的测定 分别选取不同生长期、大小基本一致的杜仲果皮和叶片, 采用索氏提取法测定杜仲橡胶含量^[18]。每个样品均取 3 次重复, 测定其含胶量。含胶增长速率计算公式为:

$$v = \frac{r - r_0}{t}$$

式中: v 为含胶增长速率; r 为后 1 次含胶量; r_0 为前 1 次含胶量; t 为 2 次测量间隔时间。

2 结果与分析

2.1 *EuHMGR* 基因全长 cDNA 克隆与序列分析

根据杜仲基因组和转录组数据库, 利用特异引物 *EuHMGR*-F1 和 *EuHMGR*-R1, 进行杜仲 *HMGR* 全长 cDNA 的 PCR 扩增, 并将所得片段进行回收测序验证。结果表明: 在杜仲果皮和叶片中均能扩增到

HMGR 基因, 该基因开放阅读框 (ORF) 长度为 1770 bp (图 1), 编码 590 个氨基酸, 相对分子质量约为 6 kDa, 等电点为 6.89。与先前已经研究报道的其他植物的 *HMGR* 基因序列相似性达 80 % 以上^[19-21] (图 2), 并

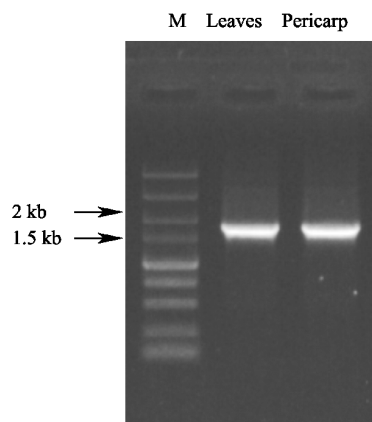
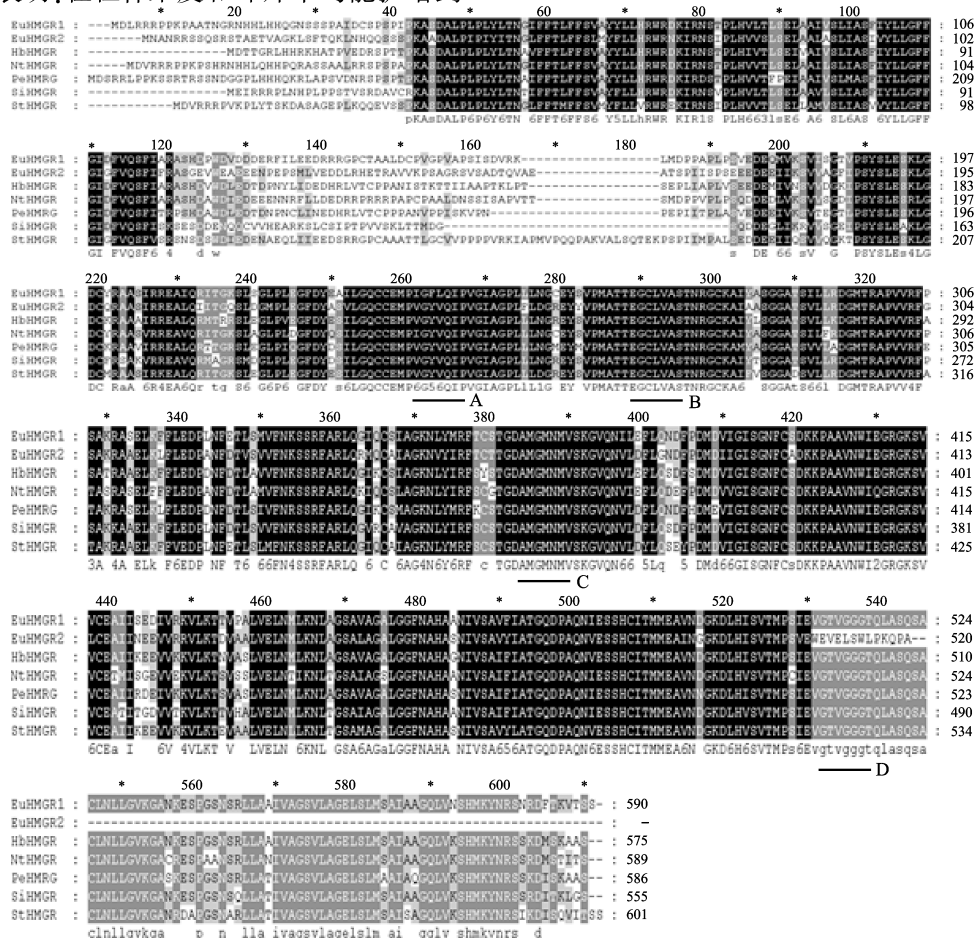


图 1 *EuHMGR* 基因 RT-PCR 扩增的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR amplification of *EuHMGR*



A: HMG-CoA-binding motif I, B: HMG-CoA-binding motif II, C: NADP(H)-binding motif I, D: NADP(H)-binding motif II

图 2 杜仲 *EuHMGR* 推测氨基酸序列与其他植物 *HMGR* 的序列比对

Fig. 2 The alignment of deduced amino acid sequences of *EuHMGR* and *HMGR* of several other plant species

且序列包括 2 个 HMG-CoA 结合位点 EMPVGYVQIP、TTEGCLVA 和 2 个 NADP(H) 结合位点 DAMGMNM、GTVGGGT^[22], 因此将其命名为 *EuHMGR*。

2.2 杜仲果皮和叶片 *EuHMGR* 基因的表达模式

为了分析 *EuHMGR* 基因在不同发育时期的表达模式, 利用 Real-time PCR 技术分析了杜仲 *HMGR* 的转录表达。如图 3 所示, *EuHMGR* 基因在不同发育时期的杜仲果皮和叶片中均有表达; 同一时期, *HMGR* 基因在果皮中的表达量在 4 月初到 5 月末均显著高于叶片, 而 7 月中旬到 8 月中旬又显著低于叶片。果皮中 *EuHMGR* 基因的表达量呈先上升后下降的趋势, 幼果时期(4 月至 5 月)表达量明显高于其他时期, 5 月中旬达到最大值。叶片中 *EuHMGR* 基因的相对表达量在 4 月中旬出现高峰之后就逐渐下降, 5 月中旬降至全年最低水平, 随即又开始上升, 在 7 月中旬达到全年最高水平。

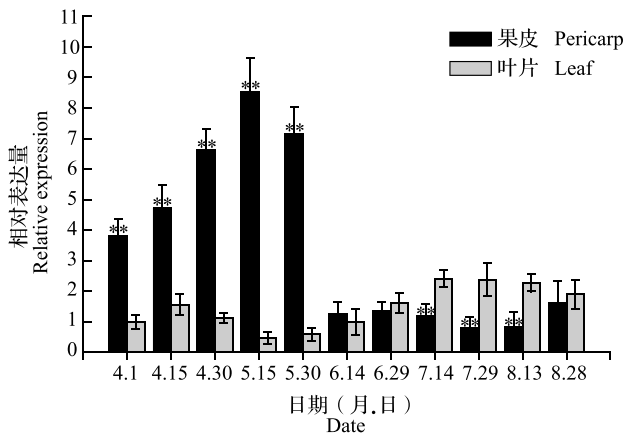


图 3 *EuHMGR* 在杜仲果皮和叶片不同发育时期的相对表达量

Fig. 3 Expression patterns of *EuHMGR* in pericarp and leaves at different developmental stages

2.3 杜仲果皮和叶片的橡胶含量

为了探究 *EuHMGR* 基因的表达与杜仲橡胶合成的相关性, 本研究对不同发育时期杜仲果皮和叶片的橡胶含量进行测定, 结果如图 4 所示, 杜仲果皮和叶片的橡胶含量均随着时间的推移而不断积累增加, 说明杜仲橡胶的合成是一个逐渐积累的过程, 且同期杜仲果皮的橡胶含量均显著高于叶片。杜仲在授粉 50d 后(4 月中旬)到 5 月下旬这一时期果皮中的橡胶含量迅速增加, 橡胶的增长速率达到最大, 随后果皮中的橡胶含量增长趋势逐渐变缓至趋于平稳。相比较杜仲果皮中的橡胶含量, 杜仲叶片的橡胶含量一直呈较平稳的增加。

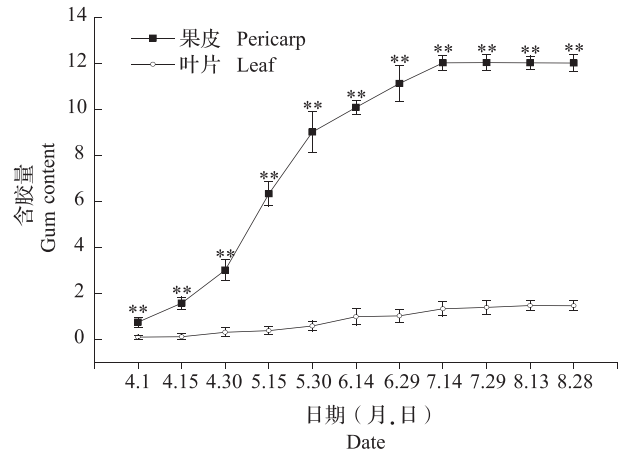


图 4 果皮和叶片不同发育时期含胶量

Fig. 4 Gum content in pericarp and leaves at different developmental stages

2.4 *EuHMGR* 基因的表达与橡胶合成的相关性分析

比较果皮 *EuHMGR* 基因不同发育时期的相对表达量和含胶增长速率的整体变化趋势发现, 该基因在果皮中的相对表达量和其含胶增长速率的变化趋势基本完全吻合(图 5), 将果皮中 *EuHMGR* 基因的表达量与相应果皮橡胶增长速率作相关性分析, 结果显示, 杜仲果皮不同发育时期 *EuHMGR* 的表达量与杜仲橡胶增长速率呈显著正相关关系 ($P < 0.01$), 相关系数为 0.842。说明果皮中 *EuHMGR* 基因的表达有利于杜仲果皮中橡胶的快速积累。

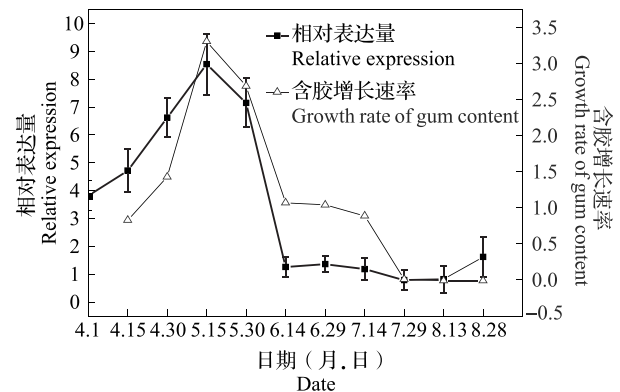


图 5 不同发育时期杜仲果皮中 *EuHMGR* 相对表达量和含胶增长速率的变化规律

Fig. 5 Expression patterns of *EuHMGR* and growth rate of gum content in pericarp at different developmental stages

由 *EuHMGR* 基因在不同发育时期杜仲叶片中的相对表达量和含胶增长速率的变化规律分析得知, *EuHMGR* 基因在杜仲叶片的相对表达量在 4 月中旬和 7 月中旬两个时间点均出现一个峰值, 而杜仲叶

片的含胶增长速率在6月中旬达到全年最高值(图6),因此,*EuHMGR* 基因的相对表达量与杜仲叶片的含胶增长速率整体变化趋势不一致。将叶片中*EuHMGR* 基因的表达量与相应叶片橡胶增长速率作相关性分析,结果显示,杜仲叶片不同发育时期*EuHMGR* 的表达量与杜仲橡胶增长速率相关性不显著($P > 0.05$)。综上所述,*EuHMGR* 基因在杜仲果皮中的表达情况与橡胶的积累趋势相类似,说明*EuHMGR* 基因对杜仲果皮橡胶的积累具有重要的作用。

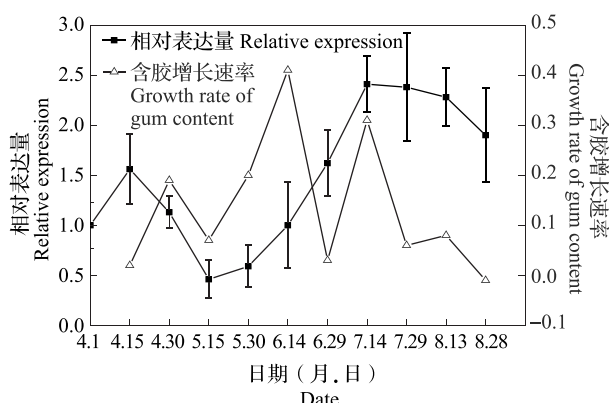


图6 不同发育时期杜仲叶片中*EuHMGR* 相对表达量和含胶增长速率的变化规律

Fig.6 Expression patterns of *EuHMGR* and growth rate of gum content in leaves at different developmental stages

3 讨论

3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(*HMGR*)是MVA途径中第1个关键限速酶,其基因的结构非常保守,目前已从多种植物中克隆出*HMGR* 基因,并对其功能进行了研究和分类。本研究分别从杜仲果皮和叶片中克隆了*EuHMGR*,并将获得的*EuHMGR* 的ORF序列和用其预测的氨基酸序列与NCBI数据库中的其他植物进行BLAST比对,发现该序列与其他植物具有较高的相似性,核酸序列基本达到70%左右,氨基酸序列达到80%以上。另外,*EuHMGR* 具有*HMGR* 基因家族的共同保守结构域:2个HMG-CoA(EMPVGYVQIP、TTEGCLVA)和2个NADP(H)结合位点(DAMGMNM、GTVGGCT)。研究表明,植物*HMGR* 基因的C-末端序列较N-末端序列相对保守,其氨基酸组成和序列长度各有差异,且N-末端疏水区对于蛋白的催化活性不起作用^[21-22],而*EuHMGR* 的C-末端序列和N-末端序列均有以上特点。序列和结构较高的相似性以及保守结构域说明本次克隆得到的*EuHMGR* 基因序列准确可靠,属

于杜仲*HMGR* 基因家族中的一员。

植物*HMGR* 基因的表达对细胞质中萜类物质的代谢起重要调控作用,决定着“碳流”的流向^[23]。目前,关于*HMGR* 基因在萜类物质生物合成中的功能研究取得了一定的进展,发现上调*HMGR* 基因的表达能增加转基因植物中萜类物质的含量,例如R. Wititsuwannakul等^[24]提出通过调节巴西橡胶*HMGR* 的活性,从而影响天然橡胶的生物合成;在银胶菊橡胶颗粒迅速合成时,*HMGR* 的活性也迅速提高^[25];在青蒿素生物合成代谢的研究中发现,*HMGR* 的酶活性与青蒿素的积累相关^[26-28];另外,将丹参*HMGR* 基因在其毛状根中超表达,发现丹参酮和角鲨烯的产量都有所增加^[29];在蹄叶皂甙萜类化合物—紫菀酮的研究中,超表达*HMGR* 基因提高了紫菀酮的含量^[30]。植物中*HMGR* 基因结构相对比较保守单一,目前发现其从进化上均来自同一祖先^[31]。杜仲*HMGR* 基因属于多基因家族^[32],同一家族成员一般在结构和功能上相类似。本研究对该家族成员中一个*HMGR* 基因在不同发育时期果皮和叶片的表达模式与相应时期含胶量进行了分析,发现*EuHMGR* 基因在杜仲果皮和叶片的不同发育时期均有表达,且在幼果期和叶片成熟期表达量较高。对杜仲果皮不同时期的橡胶积累分析发现,杜仲果皮的含胶增长速率呈先上升后下降的趋势,且杜仲幼果时期是杜仲果皮含胶量快速增长时期,含胶增长速率达到最大,随后,伴随果实的成熟果皮的含胶增长速率迅速下降,含胶量逐渐趋于平稳增长,说明杜仲果皮中橡胶的积累不是一个相对平稳的过程,主要在幼果期迅速增长,4、5月份是杜仲果皮橡胶积累的重要时期;而叶片的橡胶含量则呈平缓的增长。本研究杜仲橡胶合成趋势与杜红岩等^[33]、何文广^[34]的研究结果基本一致。杜仲果皮中*EuHMGR* 基因的表达规律与果皮含胶增长速率的变化规律相一致,从而说明*EuHMGR* 基因的表达与杜仲果皮橡胶的积累密切相关,很可能是控制杜仲果皮橡胶合成的关键限速酶基因。此外,*EuHMGR* 基因在幼果时期的表达比同期叶片高,且这一时期果皮的橡胶含量也比叶片高,同时*EuHMGR* 基因在果皮中的表达与果皮含胶增长速率相一致,推测杜仲果皮橡胶合成以MVA途径为主。这一结果与缺少叶绿体的器官如果皮、根皮和树皮等杜仲橡胶合成的上游途径主要是细胞质中的MVA途径,而叶片中的橡胶合成上游途径主要是质体中的MEP途径相一致^[35]。

本研究克隆了杜仲*EuHMGR* 基因,并分析解释

了 *EuHMGR* 基因的表达模式对杜仲橡胶合成的影响,为后续开展鉴定该基因功能,揭示杜仲橡胶生物合成机制提供了重要的基础。

参考文献

- [1] 杜红岩,胡文臻,俞锐,等. 中国杜仲橡胶资源与产业发展报[M]. 北京:社会科学文献出版社,2014:8-14
- [2] Ernest F, Weiss B. The Caoutchouc-containing Cells of *Eucommia ulmoides*, Oliver [Z]. Montana USA: Kessinger legacy reprints, 1892, 3:243-254
- [3] Lynen F, Efferer H, Henning U, et al. Farnesyl-pyrophosphat und 3-Methyl- Δ^3 -butenyl-1-pyrophosphat die biologischen Vorstufen des Squalens Zur Biosynthese der Terpene, III [J]. Angew Chem, 1958, 70:738-742
- [4] Chaykin S, Law J, Phillips A H, et al. Phosphorylated intermediates in the synthesis of squalene [J]. PNAS, 1958, 44:998-1004
- [5] Duilio A, Silvia S, Christoph L, et al. Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement [J]. PNAS, 1997, 94:10600-10605
- [6] Michel R. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants [J]. Nat Prod Rep, 1999, 16:565-574
- [7] Takeshi B, Michiko M, Koichirou G, et al. Contribution of mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to polyisoprenoid biosynthesis in the rubber-producing plant *Eucommia ulmoides* Oliver [J]. Z Naturforsch C, 2010, 65:363-72
- [8] Chappell J, Wolf F, Proulx J, et al. Is the reaction catalyzed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase a rate-limiting step for isoprenoid biosynthesis in plants [J]. Plant Physiol, 1995, 109:1337-1343
- [9] 黄晶,段续伟,张文娜,等. 杜梨 *HMGR* 基因克隆及其转基因烟草种子耐盐性分析 [J]. 中国农业大学学报, 2015, 20(1): 60-67
- [10] 张琳,王继涛,张大为,等. 珍稀濒危药用铁皮石斛 *HMGR* 基因的克隆和特征分析 [J]. 药学报, 2014, 49(3): 411-418
- [11] Liu Y, Xu Q X, Xi P Y, et al. Cloning and characterization of a cDNA coding 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase involved in glycyrrhizic acid biosynthesis in *Glycyrrhiza uralensis* [J]. Acta Pharm Sin, 2013, 48:773-779
- [12] Wang Q C, Li S Z, Xiao X Z. Cloning and expression analysis of *HMGR* gene from *Taraxacum kok-saghyz* [J]. BBR, 2012, 32: 61-68
- [13] 蒋春,张华玲,彭江. 尾巨桉 *HMGR* 基因的克隆及表达分析 [J]. 广西植物, 2012, 32(1): 113-117
- [14] 彭江,孙一铭,宋锋,等. 尾巨桉 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶基因的克隆及表达分析 [J]. 林业科学, 2011, 47(2): 164-168
- [15] 刘卉. 阳春砂 *HMGR* 和 *DXR* 基因在烟草萜类化合物生物合成中的功能研究 [D]. 广州:广州中医药大学, 2012
- [16] Aquil S, Husaini A M, Abidin M Z, et al. Overexpression of the HMG-CoA reductase gene leads to enhanced artemisinin biosynthesis in transgenic *Artemisia annua* plants [J]. Planta Med, 2009, 75:1453-1458
- [17] Schaller H, Grausem B, Benveniste P, et al. Expression of the *Hevea brasiliensis* (H. B. K.) Mull. Arg. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase 1 in tobacco results in sterol overproduction [J]. Plant Physiol, 1995, 109:761-770
- [18] Chen R, Harada Y, Bamba T, et al. Overexpression of an isopentenyl diphosphate isomerase gene to enhance trans-polyisopreneproduction in *Eucommia ulmoides* Oliver [J]. BMC Biotechnol, 2012, 12:78
- [19] Kato-Emori S, Higashi K, Hosoya K, et al. Cloning and characterization of the gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in melon (*Cucumis melo* L. reticulatus) [J]. Mol Gen Genet, 2001, 265:135-142
- [20] Liao Z H, Tan Q M, Chai Y R, et al. Cloning and characterization of the gene encoding HMG-CoA reductase from *Taxus media* and its functional identification in yeast [J]. Funct Plant Biol, 2004, 31:73-81
- [21] Ruiz-Albert J, Cerda-Olmedo E, Corrochano L M. Genes for mevalonate biosynthesis in *Phycomyces* [J]. Mol Genet Genomics, 2002, 266:768-777
- [22] 罗红梅,宋经元,李雪莹,等. 人参皂苷合成生物学关键元件 *HMGR* 基因克隆与表达分析 [J]. 药学报, 2013, 48(2): 219-227
- [23] 王启超,刘实忠,校现周. 橡胶草 *HMGR* 基因的克隆及表达分析 [J]. 植物研究, 2012, 32(1): 61-68
- [24] Wititsuwannakul R, Wititsuwannakul D, Suwanmanee P. Purification and characterization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from latex of *Hevea* [J]. Phytochemistry, 1990, 29: 1401-1403
- [25] Wan J, Benedict C R, Foster M A. Seasonal variations in rubber biosynthesis, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, and rubber transferase activities in *Parthenium argentatum* in the Chihuahuan Desert [J]. Plant Physiol, 1993, 103:535-542
- [26] Nafis T, Akmal M, Ram M, et al. Enhancement of artemisinin content by constitutive expression of HMG-CoA Reductase gene in high yielding strain of *Artemisia annua* L. [J]. Plant Biotechnol Rep, 2011, 5:53-60
- [27] Alam P, Abidin M Z. Over-expression of HMG-CoA reductase and amorpho-4,11-diene synthase genes in *Artemisia annua* L. and its influence on artemisinin content [J]. Plant Cell Rep, 2011, 30: 1919-1928
- [28] Ram M, Khan M A, Jha P, et al. HMG-CoA reductase limits artemisinin biosynthesis and accumulation in *Artemisia annua* L. plants [J]. Acta Physiol Plant, 2010, 32:859-866
- [29] Dai Z B, Cui G H, Zhou S F, et al. Cloning and characterization of a novel 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene from *Salvia miltiorrhiza* involved in diterpenoid tanshinone accumulation [J]. J Plant Physiol, 2011, 168:148-157
- [30] 杜娟. 蹄叶橐吾萜类化合物合成相关基因克隆及功能研究 [D]. 吉林:吉林大学, 2007
- [31] Li W, Liu W, Wei H, et al. Species-specific expansion and molecular evolution of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (*HMGR*) gene family in plants [J]. PLoS One, 2014, 9:e94172
- [32] 乌云塔娜,王淋,叶生晶,等. 杜仲 *EuHMGRS* 基因家族的鉴定及生物信息学分析 [J]. 经济林研究, 2013, 31(4): 16-24
- [33] 杜红岩,杜兰英,李福海,等. 不同产地杜仲树皮含胶特性的变异规律 [J]. 林业科学, 2004, 40(5): 186-190
- [34] 何文广. 杜仲叶中杜仲胶含量与相对分子质量的动态变化 [J]. 经济林研究, 2011, 29(1): 46-51
- [35] 王淋. 杜仲橡胶合成相关酶基因的克隆及功能研究 [D]. 湖南:中南林业科技大学, 2014