

• 药材与资源 •

铁皮石斛 1-羟基-2-甲基-2-(*E*)-丁烯基-4-焦磷酸还原酶基因的克隆与表达分析吴秋菊, 武梅娟[#], 王翔, 林毅, 蔡永萍, 樊洪泓^{*}

安徽农业大学生命科学学院, 安徽 合肥 230036

摘要: 目的 从铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 中克隆 1-羟基-2-甲基-2-(*E*)-丁烯基-4-焦磷酸还原酶 [1-hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphatereductase, HDR] 基因, 并分析其在铁皮石斛不同组织中的表达差异以及不同信号分子诱导下的表达模式。方法 采用 RT-PCR 和 RACE 等方法获得铁皮石斛 HDR 基因 (DoHDR) 全长, 利用 DNAMAN 和 MEGA6.0 对其其他物种的 HDR 基因编码的氨基酸序列进行同源性分析和进化关系分析, 使用实时荧光定量分析 HDR 基因的表达模式。结果 成功获得 DoHDR 基因, GenBank 登录号为 KC344827, 全长 1 658 bp, 编码 460 个氨基酸, 与其他科属植物的同源性达到 80% 以上。DoHDR 基因在铁皮石斛叶片中表达量最高, 从高到低依次是根、茎、原球茎; 且受到脱落酸 (abscisic acid, ABA)、水杨酸 (salicylic acid, SA) 信号分子的诱导。结论 从铁皮石斛中获得 DoHDR 基因, 为进一步阐明铁皮石斛萜类化合物合成途径中该基因的重要作用奠定了理论基础。

关键词: 铁皮石斛; 1-羟基-2-甲基-2-(*E*)-丁烯基-4-焦磷酸还原酶; 基因克隆; 表达分析; 萜类

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)03-0405-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.03.019

Cloning and expression analysis of 1-hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphatereductase gene in *Dendrobium officinale*

WU Qiu-ju, WU Mei-juan, WANG Xiang, LIN Yi, CAI Yong-ping, FAN Hong-hong

School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

Abstract: **Objective** To clone the full-length cDNA encoding 1-hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphatereductase (HDR) gene from *Dendrobium officinale* (DoHDR), then to analyze the expression difference in different tissues and expression patterns of DoHDR induced by signal molecule. **Methods** RT-PCR and RACE technologies were used to clone the full length cDNA of DoHDR. The analyses of homologous comparison and phylogenetic tree were performed using DNAMAN and MEGA6.0 softwares, then the expression patterns of DoHDR were studied by real-time PCR. **Results** The DoHDR gene was successfully obtained (GenBank accession number KC344827), and the full-length cDNA was 1 658 bp, coding the protein containing 460 amino acids. DoHDR had high homology ($\geq 80\%$) with HDR proteins from other plants. Tissue expression analysis showed that DoHDR had the highest expression in the leaves, followed by roots, stems, and protocorm. Quantitative PCR results showed that DoHDR could be induced by signal molecule such as abscisic acid (ABA) and salicylic acid (SA). **Conclusion** The cDNA encoding DoHDR is cloned. It is helpful for the future research on the mechanism of terpenoid biosynthesis in *D. officinale*.

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; 1-hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphatereductase; gene cloning; expression analysis; terpenoid

石斛是我国传统的名贵珍稀中药材^[1], 素有“千金草”之称, 铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 是石斛属药用植物的一种, 具有益胃生津、滋阴清热等功效^[2], 与其他石斛区分而单列出来录入《中国药典》2010 年版, 由此可见铁皮石斛的名

贵珍稀。

铁皮石斛具有悠久的药用历史, 能治疗多种疾患。多年的研究发现该植物含有多种化学成分, 药用成分既丰富又均衡, 其中, 生物碱和多糖是其最主要的成分^[3]。研究表明, 铁皮石斛多糖具有提高

收稿日期: 2014-09-29

基金项目: 安徽省科技攻关项目 (1301032139); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (201310364006)

作者简介: 吴秋菊 (1990—), 女, 安徽灵璧人, 硕士在读, 研究方向为药用植物分子生物学。E-mail: youyanqj@163.com

*通信作者 樊洪泓 (1980—), 女, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为药用植物生物技术。Tel: (0551)65786216 E-mail: hhfan0551@126.com

[#]为共同第一作者

免疫力、抗氧化等功效^[4]；生物碱具有抗肿瘤^[5]、止痛退热、改善心血管功能和治疗胃肠道疾病等作用。目前，已有研究表明，石斛属植物中的生物碱大多属于倍半萜类生物碱或萜类吲哚生物碱^[6]，两类生物碱生物合成均起源于萜类途径（MEP 途径、MVA）。在高等植物中萜类物质通过 2 个途径合成，即位于细胞质中的甲羟戊酸（mevalonate-pathway，MVA）途径和位于质体中的甲基赤藓-4-磷酸途径（methylerythritol-4-phosphate pathway，MEP）。异戊烯焦磷酸（isopentenyl diphosphate，IPP）和二甲基烯丙基焦磷酸（dimethylallyl diphosphate，DMAPP）是这 2 条萜类化合物合成途径的共同前体，所有的萜类化合物都是由这 2 个化合物衍生得到的；4-羟基-3-甲基-2-丁烯基焦磷酸还原酶（HDR）是 MEP 途径中的末端活性酶，以 5：1 的比例催化 HMBPP 同时生成 IPP 和 DMAPP 的混合物^[7]；因此，在 MEP 途径中，HDR 具有提供前体萜类物质和主要限速作用^[8]。

目前，HDR 基因已经从拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.^[9]、银杏 *Ginkgo biloba* L.^[10]、橡胶树 *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Muell. Arg^[11]、喜树 *Camptotheca acuminata* Decne.^[12]、黄花蒿 *Artemisia annua* L.^[13]、紫杉 *Taxus media* Cheng et L. K. Fu^[14]、萝芙木 *Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baill.^[15]等植物中克隆得到，但在铁皮石斛中仍未见报道。本实验以铁皮石斛为材料，采用 RT-PCR 和 RACE 等方法克隆铁皮石斛 HDR（DoHDR）基因全长，并对其序列进行生物信息学分析，研究其在不同组织器官中的表达差异，以及不同信号分子对其

诱导表达的模式，为进一步研究 HDR 基因在铁皮石斛萜类物质生物合成途径中的作用提供理论依据。

1 材料与试剂

1.1 材料

铁皮石斛组培苗取自本实验室，经安徽农业大学生命科学学院蔡永萍教授鉴定为铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo。

1.2 主要试剂

总 RNA 提取试剂盒 RNAprep Pure Plant Kit、PrimScript™ First Strand cDNA Synthesis Kit 购自北京 Tiangen 公司；pMD18-T 载体试剂盒、RACE 试剂盒、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 均购自 TaKaRa 公司。

2 方法

2.1 总 RNA 的提取与 cDNA 合成

取新鲜的铁皮石斛组培苗 0.1 g，用灭菌水清洗去除残留培养基，并用滤纸吸干，液氮中迅速研磨成粉末，然后按照 RNAprep Pure Plant Kit (Tiangen) 说明书进行 RNA 提取。利用微量分光光度计检测 RNA 浓度和质量。并以此为模板按照 FastQuant RT Kit (Tiangen) 说明书进行 cDNA 第一条链合成。

2.2 引物设计

根据 GenBank 上已登录的植物 HDR 氨基酸序列，如拟南芥、罗汉果、银杏、长春花、橡胶树等，利用 DNAMAN 软件多重比对，比较氨基酸同源性，并挑选 2 段高度保守区段序列，据此设计一对简并引物 HDR-S、HDR-R（表 1）。

2.3 DoHDR 基因保守区片段的扩增

首先以反转录合成的 cDNA 为模板，利用引物

表 1 引物名称及序列

Table 1 Names and sequences of primers

引物用途	引物名称	引物序列（5'-3'）
核心片段	HDR-S	GCNGTNCARATHGCNTAYGARGC
	HDR-R	GCDATYTTRTTNCCNGGNCCDAT
3'RACE	HDR-3-OUT	TGGGTATCAAAGGTCTGGAACA
	HDR-3-IN	GTGATTACATTCTTGAGGGC
5'RACE	HDR-5-OUT	ATAGCATCTTGCCGCTCCTGAGTC
	HDR-5-IN	CTACTCCATGTTTTTCGCATC
全长	HDR-CDS-S	ATACCCGGGCGCGGATGGCGCTTTCACCTCGCCGGTTT
	HDR-CDS-R	GCCTGCAGCTATGCTGTTTGAGGACTTCCTCAT
QRT-PCR	HDR-RTS	ACGATGCTCAAGACTGAGACAG
	HDR-RTR	ATTCCACCCACCAACAACGA
	β-actin-RTS	GGTATTGTGTTGGATTCCG
	β-actin-RTR	TGAGTAGCCCCCTCTCTGTGAG

HDR-S 和 HDR-R 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 25 μ L, 其中正反向引物各 1.5 μ L, 模板 cDNA 2 μ L, Taq 酶 (5 U/ μ L) 0.25 μ L, dNTP (10 mmol/L) 2 μ L, 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ L, 用 ddH₂O 补充至总体积 25 μ L; 反应程序为 94 $^{\circ}$ C、5 min, 94 $^{\circ}$ C、45 s, 60 $^{\circ}$ C、45 s, 72 $^{\circ}$ C、1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C、10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后, 根据 DNA 胶回收试剂盒说明书对目的片段进行回收, 然后连接克隆载体 pMD18-T, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 经 LB 固体培养基过夜培养后, 挑取单菌落经菌液 PCR 鉴定后委托上海生工进行测序。

2.4 DoHDR 基因的 RACE 扩增及全长 cDNA 序列的获得

参照 TaKaRa 3'-Full RACE Kit 和 5'-Full RACE Kit 说明书将铁皮石斛总 RNA 分别反转录成 cDNA; 按照 TaKaRa 3'RACE 和 5'RACE 试剂盒说明书, 以及已得到的核心片段序列, 使用 Primer Premier 5.0 设计 3'RACE 和 5'RACE 反应所需的巢式引物 HDR-3-OUT、HDR-3-IN、HDR-5-OUT、HDR-5-IN (表 1); 分别对 HDR 基因的 3'和 5'端进行 PCR 扩增, PCR 产物的回收, TA 克隆与测序方法均同“2.3”项。测序完成后利用 DNAMAN 软件将 HDR 基因的核心片段、3'和 5'端序列进行拼接, 获得该基因的全长 cDNA 序列。

根据拼接得到的全长序列, 分别在 5'和 3'端设计带有酶切位点的特异性引物 HDR-CDS-S、HDR-CDS-R (表 1), 进行 PCR 扩增获得目的基因, PCR 产物的回收, TA 克隆与测序方法均同“2.3”项。

2.5 DoHDR 基因的序列分析

将所获得的 DoHDR 基因编码的氨基酸序列在 GenBank 数据库中进行 Blast P 比对分析, 利用 DNAMAN 对其他物种的 HDR 基因编码的氨基酸序列进行同源性分析。通过 MEGA6.0 软件中的 Neighbor-Joining 法构建 DoHDR 与其他物种 HDR 蛋白的系统进化树。

2.6 DoHDR 基因的表达分析

将脱落酸 (abscisic acid, ABA) 和水杨酸 (salicylic acid, SA) 母液滤过除菌溶于已高温灭菌的 MS 培养液中分别得到终浓度为 100 μ mol/L 的 ABA 和 SA 培养液。取相同时期的铁皮石斛原球茎分别转入 ABA 和 SA 培养液中, 经悬浮培养后, 分别在 0、4、8、12、24、48、72 h 取样, 立即放入液氮中速冻, 并移至 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

采用 RNAPrep Pure Plant Kit (Tiangen) 说明书分别提取保存样品的总 RNA, 同种方法分别提取铁皮石斛原球茎、根、茎、叶总 RNA; 利用超微量分光光度计检测 RNA 浓度和质量。将上述的总 RNA 用 PrimeScriptTM RT Reagent Kit (TaKaRa) 反转录成 cDNA。以持家基因 β -actin^[16] (β -actin-RTS 和 β -actin-RTR, 表 1) 为内参, 检测 DoHDR 基因的相对表达量。根据 HDR 基因的全长 cDNA 序列采用 Primer Premier 5.0 设计实时荧光定量 PCR 引物 HDR-RTS、HDR-RTR (表 1)。实时荧光定量 PCR 采用 20 μ L 反应体系: 10 μ L SYBR[®] Premix Ex TaqTM II (2 $\times$), 2 μ L cDNA, 0.8 μ L HDR-RTS 和 HDR-RTR; 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C、30 s, 95 $^{\circ}$ C、5 s, 60 $^{\circ}$ C、34 s, 40 个循环。试验进行 3 次重复; 结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法来计算基因相对表达量。

3 结果与分析

3.1 DoHDR 基因全长的克隆

以铁皮石斛总 RNA 反转录的 cDNA 为模板, 用简并引物 HDR-S、HDR-R 扩增得到 1 条约 850 bp 的 PCR 产物, 扩增产物符合引物设计的大小 (图 1-A)。胶回收产物经 TA 克隆和测序分析得到该基因核心片段, 长度为 851 bp, 将该片段在 NCBI 的数据库中进行 Blast 分析, 发现该序列与其他植物的 HDR 的核酸序列相似度较高, 可见获得的片段为石斛 HDR 基因的核心片段。

根据已经获得的铁皮石斛 HDR 基因核心区段的 DNA 序列设计 3'RACE 和 5'RACE 引物, 进行 PCR 扩增, 获得 HDR 基因的 3'端 923 bp (图 1-B) 和 5'端 893 bp (图 1-C)。在此基础之上, 以铁皮石斛的 cDNA 为模板进行 HDR 基因的全长扩增, 得到 cDNA 全长, 为 1 658 bp (图 1-D)。通过开放阅读框 (ORF) 软件分析, 结果显示拼接序列具备完整基因的序列, ORF 长度为 1 383 bp, 编码 460 个氨基酸, 命名为 DoHDR, 并提交 GenBank 数据库 (登录号 KC344827)。

3.2 DoHDR 氨基酸序列的同源性分析和系统进化关系分析

对铁皮石斛 DoHDR 基因编码的氨基酸序列在 NCBI 上进行 Blast P 比对, 通过 DNAMAN 软件与多种植物进行比对分析 (图 2), 比对结果表明 DoHDR 氨基酸序列与土沉香 (AHE93332)、橡胶树 (ACG55683)、长春花 (ABI30631)、银杏 (ABC84344) 等植物的同源性分别 74.26%、73.84%、



Fig. 1 Clone of full-length cDNA of DoHDR gene

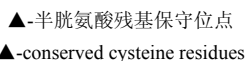


Fig. 2 Homologous comparison of amino acid sequence of HDR in *D. officinale* and other plants

71.73%、70.68%，说明 HDR 基因在进化过程中较为保守。与其他植物多序列比对后发现(图 2)，DoHDR 与其他参与比对的植物一致，都含有 4 个保守的半胱氨酸残基活性位点，这些活性位点被认为可能参与催化底物还原过程中铁硫键的形成^[16]。

利用 MEGA6.0 软件中的 Neighbor-Joining 方法，对推测蛋白 DoHDR 与 GenBank 记载登录的 16 个植物的 HDR 蛋白之间构建系统进化树，进行聚类分析。结果表明，不同来源的 HDR 蛋白属不同的进化分支，裸子植物、单子叶植物及双子叶植物 HDR 之间有较为清晰的界限。铁皮石斛与文心兰 *Oncidium Gower Ramsey* 同为兰科植物，亲缘关系最为接近，其次和同是单子叶植物的水稻 *Oryza sativa indica* Group、玉米 *Zea mays* L.、高粱 *Sorghum bicolor* (Forssk.) Stapf 聚为一类，由此可见植物 HDR 蛋白的分子进化关系与传统植物分类中的进化关系较为一致(图 3)。

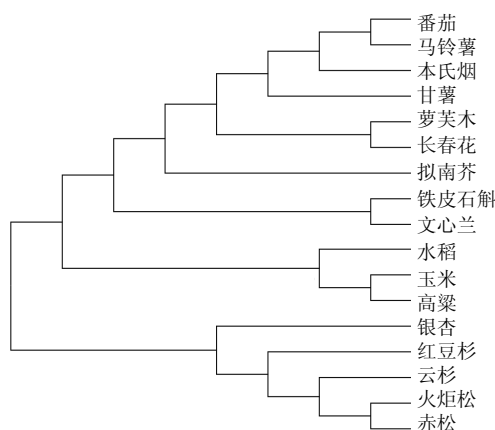


图 3 铁皮石斛与其他植物 HDR 氨基酸的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of HDR in *D. officinale* and other plants

3.3 DoHDR 基因在铁皮石斛中的组织特异性表达分析

以铁皮石斛的原球茎、根、茎、叶为材料，选择持家基因 β -actin^[16] 为内参，对不同组织中 DoHDR 基因表达水平进行实时荧光定量 PCR 检测。结果显示 DoHDR 在铁皮石斛各组织中都有表达，且表达量依次为叶>根>茎 $\approx$ 原球茎(图 4)；其中在叶中 DoHDR 表达量高达原球茎中的 2.7 倍。

3.4 ABA 和 SA 处理对 DoHDR 表达量的影响

ABA 和 SA 是非常重要的植物激素，同时也

是植物体内重要的信号分子，不仅可提高植物抗性，调节植物生长，而且可有效诱导萜类和酚酸类等次生代谢物质的合成积累。实验结果表明(图 5、6)，DoHDR 表达量在 2 种处理后的趋势都是先上升后下降；在 8 h 后 DoHDR 基因表达量均显著升高；且 48 h 均达到峰值，ABA 和 SA 处理 48 h 的 DoHDR 表达量与对照比较分别升高了 6.3、3.3 倍；但在 72 h DoHDR 基因表达量均出现了下降的趋势。

4 讨论

铁皮石斛是我国兰科石斛属中珍稀濒危特有种，具有重要的药用成分和药理活性，其中萜类物质是铁皮石斛的主要药效成分之一。本研究从铁皮石斛

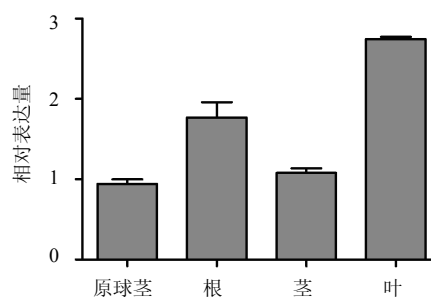


图 4 DoHDR 基因在铁皮石斛中的组织特异性表达分析

Fig. 4 Tissue-specific expression of DoHDR in *D. officinale*

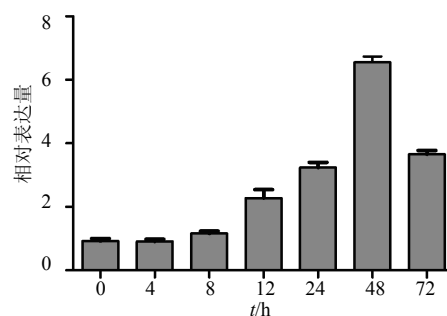


图 5 ABA 处理对 DoHDR 表达量的影响

Fig. 5 Effect of ABA on expression of DoHDR

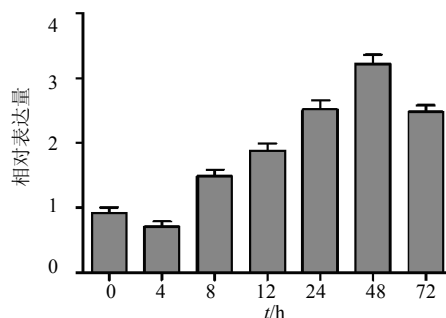


图 6 SA 处理对 DoHDR 表达量的影响

Fig. 6 Effect of SA on expression of DoHDR

中克隆出萜类化合物生物合成 MEP 途径上最后一个关键酶基因——DoHDR。HDR 被认为是 MEP 途径的最后一个限速酶,在 MEP 途径中起着关键的调节代谢流的作用^[17];而且其表达量的变化直接影响到萜类代谢物的产量。研究表明,DoHDR 全长 1 658 bp,编码了 460 个氨基酸;序列比对分析结果表明 DoHDR 与其他植物的 HDR 具有很高的同源性,保守结构域分析显示 DoHDR 为一多结构域蛋白,属 LYTb 蛋白家族,结构域中包括保守的半胱氨酸残基活性位点、底物结合位点和催化位点。

本研究表明,DoHDR 在铁皮石斛的不同组织中均有表达,但存在一定的表达差异。DoHDR 在叶、根与茎的表达量分别为对照(原球茎)的 2.7、1.9、1.1 倍,在叶中表达量最高,这与其在甘薯中 HDR 基因的表达特征较为一致^[18],而在银杏^[19]和橡胶^[11]中,HDR 在根部表达量显著高于茎与叶片中,这说明相同基因在不同植物的不同组织部位中的表达量存在很大的差异,而同一植物不同组织部位的萜类代谢物的类型和量也存在很大的区别。已有研究表明,信号分子可诱导 HDR 基因的表达,实验中,经 ABA 和 SA 处理后 DoHDR 的表达呈现短时间内显著升高然后下降的趋势,这与在茶树中经 ABA 和 SA 处理后 HDR 表达量总体变化趋势相似^[20];经两种信号物质处理后 DoHDR 表达量 8 h 后开始显著上调,48 h 达到峰值,72 h 又显著下调,这与在喜树中施用水杨酸后 HDR 的表达量也在 72 h 显著下调一致^[12]。综上所述,表明 DoHDR 的表达受 ABA 和 SA 调控。研究 DoHDR 在铁皮石斛植物不同器官中的表达特征及其在不同处理条件下的基因表达变化对探究其参与合成的萜类物质代谢具有指导作用。

参考文献

- [1] 包雪声,顺庆生,陈立钻. 中国药用石斛 [M]. 上海:上海医科大学出版社,2001.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 李昊,吕鼎豪. 铁皮石斛药用成分研究进展 [J]. 光谱实验室,2013(4): 1845-1849.
- [4] 杨兵勋,于善凯,孙继军,等. 铁皮石斛与大豆异黄酮提取物协同抗氧化作用评价 [J]. 中国现代应用药学杂志,2009,26(11): 885-887.
- [5] 郭勇,程晓磊. 石斛在恶性肿瘤治疗中的作用 [J]. 浙江中西医结合杂志,2007,17(7): 454-455.
- [6] Guo X, Li Y, Li C, et al. Analysis of the *Dendrobium officinale* transcriptome reveals putative alkaloid biosynthetic genes and genetic markers [J]. *Gene*, 2013, 527(1): 131-138.
- [7] Adam P, Hecht S, Eisenreich W, et al. Biosynthesis of terpenes: studies on 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase [J]. *Prod Nat Acad Sci*, 2002, 99(19): 12108-12113.
- [8] Guevara-García A, San Román C, Arroyo A, et al. Characterization of the *Arabidopsis clb6* mutant illustrates the importance of posttranscriptional regulation of the methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway [J]. *Plant Cell Online*, 2005, 17(2): 628-643.
- [9] Hsieh M H, Goodman H M. The *Arabidopsis* IspH homolog is involved in the plastid nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis [J]. *Plant Physiol*, 2005, 138(2): 641-653.
- [10] Kim S M, Kuzuyama T, Kobayashi A, et al. 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase (IDS) is encoded by multicopy genes in gymnosperms *Ginkgo biloba* and *Pinus taeda* [J]. *Planta*, 2008, 227(2): 287-298.
- [11] Sando T, Takeno S, Watanabe N, et al. Cloning and characterization of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway genes of a natural-rubber producing plant, *Hevea brasiliensis* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, 72(11): 2903-2917.
- [12] Wang Q, Pi Y, Hou R, et al. Molecular cloning and characterization of 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase (CaHDR) from *Camptotheca acuminata* and its functional identification in *Escherichia coli* [J]. *BMB Rep*, 2008, 41(2): 112-118.
- [13] Peng M F, Chen M, Chen R, et al. The last gene involved in the MEP pathway of *Artemisia annua*: cloning and characterization and functional identification [J]. *J Med Plants Res*, 2011, 5(2): 223-230.
- [14] Sun Y M, Chen M, Tang J, et al. The 1-hydroxy-2-methyl-butanyl 4-diphosphate reductase gene from *Taxus media*: cloning, characterization and functional identification [J]. *Afr J Biotechnol*, 2009, 8(18): 4339-4346.
- [15] Lan X. Molecular cloning and characterization of the gene encoding 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase from hairy roots of *Rauvolfia verticillata* [J]. *Biologia*, 2013, 68(1): 91-98.

- [16] Jin Q, Yao Y, Cai Y, *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of a phenylalanine ammonia-lyase gene from *Dendrobium* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62352.
- [17] Botella-Pavía P, Besumbes Ó, Phillips M A, *et al.* Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors [J]. *Plant J*, 2004, 40(2): 188-199.
- [18] Wang G, Chen M, Liu X, *et al.* Molecular cloning and characterization of the HDR gene involved in the methyl-erythritol phosphate (MEP) pathway from *sweet potato* [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] [J]. *Afr J Agric Res*, 2012, 7(2): 205-211.
- [19] Lu J, Wu W, Cao S, *et al.* Molecular cloning and characterization of 1-hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphate reductase gene from *Ginkgo biloba* [J]. *Mol Boil Rep*, 2008, 35(3): 413-420.
- [20] 蒋正中. 茶树 MEP 途径中 HDS 与 HDR 基因的 cDNA 全长克隆, 功能分析与表达特征研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2013.