

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2017.12.007

# 青蒿 *HMGR* 基因家族克隆及 对茉莉酸甲酯和损伤的响应<sup>①</sup>

陈俞裴<sup>1</sup>, 申甜<sup>1,2</sup>, 邱飞<sup>1</sup>, 陈敏<sup>3</sup>,  
廖志华<sup>1</sup>, 兰小中<sup>4</sup>, 杨春贤<sup>1</sup>

1. 西南大学 生命科学学院/三峡库区生态环境教育部重点实验室/西藏农牧学院药用植物联合研发中心, 重庆 400715;
2. 江川县第一中学, 云南 玉溪 6526003; 3. 西南大学 药学院, 重庆 400715;
4. 西藏农牧学院 食品科学学院, 西藏 林芝 860000

**摘要:** 通过全基因组序列测定和 RACE 技术, 从青蒿(*Artemisia annua* L.) 克隆出了 3 条编码 *HMGR* 的 cDNA 序列: *AaHMGR1*, *AaHMGR2* 和 *AaHMGR3*, 并对 3 条基因进行生物信息学分析. 结果表明: 3 条序列与其他物种的 *HMGR* 具有高度相似性但基因组结构不一致; 组织表达分析中, *AaHMGR1* 在茎中表达量最高, 而 *AaHMGR2* 和 *AaHMGR3* 在花中表达量较高; 外源茉莉酸甲酯(MeJA) 诱导处理后 *AaHMGR1* 的表达在 0.5 h 时达到最大值, *AaHMGR2* 和 *AaHMGR3* 则轻微响应; 机械损伤 3 h 后能够使 *AaHMGR1* 的表达量上调约 700 倍, 而 *AaHMGR2*, *AaHMGR3* 上调幅度却不大. 综上所述研究表明, *AaHMGR1* 基因可能在青蒿素的生物合成中起着更为重要的作用.

**关键词:** 青蒿; *HMGR*; MeJA; 损伤; 青蒿素

**中图分类号:** Q946.889

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-9868(2017)12-0044-08

青蒿素是从青蒿(*Artemisia annua* L.) 中分离的一种含有过氧桥基团结构的新型倍半萜内酯<sup>[1]</sup>, 对于治疗脑型疟疾和抗氯喹恶性疟疾有特效<sup>[2]</sup>. 青蒿素联合治疗法(Artemisinin Combination Therapies, ATCs)是世界卫生组织(WHO)唯一推荐使用的基于青蒿素治疗疟疾的最有效的治疗方法<sup>[2]</sup>. 青蒿中青蒿素含量很低, 从天然青蒿中提取青蒿素远不能满足巨大市场需求<sup>[3]</sup>, 提高青蒿素产量成为一项迫切任务. 目前, 通过代谢工程提高青蒿素产量主要在两方面开展研究: 采用合成生物学在酵母中合成青蒿酸并进而光氧化形成青蒿素<sup>[4]</sup>; 采用代谢工程技术培育青蒿素超高产青蒿新品种<sup>[5]</sup>. Keasling 团队<sup>[6]</sup>在酵母中成功的实现了青蒿素的部分合成, 但是其现有的年产量有限且成本较高, 无法满足巨大市场需求. 培育青蒿素超高产青蒿新品种仍然是很有前景的研究方向. 开展青蒿素合成途径分子生物学研究是实现青蒿代谢工程育种的前体. 甲瓦龙酸途径(MVA 途径)为青蒿素生物合成提供基本 5 碳前体, 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, *HMGR*)催化 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 形成甲羟戊酸. 在植物中, *HMGR* 基因以家族形式存在, 提高 *HMGR* 表达能促进萜类积累<sup>[7]</sup>. 在青蒿中超量表

① 收稿日期: 2016-12-27

基金项目: 新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-12-0930).

作者简介: 陈俞裴(1992-), 女, 四川广安人, 硕士, 主要从事植物生物学与生物技术的研究.

通信作者: 杨春贤, 研究员, 硕士研究生导师.

达外源 *HMGR* 基因能显著提高青蒿素含量<sup>[8]</sup>。然而,关于青蒿 *HMGR* 家族研究未见报道,各家族成员在青蒿素生物合成中的具体贡献也不清楚。

本研究以青蒿为研究对象,根据我们和上海交通大学联合测定的青蒿全基因组序列(未公开),结合 RACE 技术克隆青蒿 *HMGR* 家族基因,并对其进行了生物信息学分析。通过实时荧光定量 PCR 技术,对 3 条 *HMGR* 基因进行了组织表达特异性分析,以及 MeJA 和损伤诱导的表达模式分析。通过不同层面的实验数据以及分析,解析青蒿 *HMGR* 家族成员不同功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料以及处理

材料为具有相同遗传背景青蒿快繁幼苗(Xiang et al)<sup>[10]</sup>。参照 Wang 等<sup>[12]</sup>和 Liu 等<sup>[13]</sup>的方法进行 MeJA 和损伤处理。将实验材料用液氮研磨,提取 RNA 后反转录合成 cDNA 用于后续实验,提取 RNA 和反转录方法参考 Liu<sup>[13]</sup>的方法。

### 1.2 基因克隆

根据青蒿全基因组、trichOME Database、NCBI 上已经报道的青蒿 *HMGR* 基因片段,利用 Vector NTI suite 11.5 软件进行拼接与比对找到 3 条不同的青蒿 *HMGR* 序列,根据这 3 条序列分别设计 3'RACE 巢式 PCR 引物(表 1),利用引物、dNTP 和 HiFi 酶等按巢式 PCR 程序扩增获得 *AaHMGRs* 的 3'RACE,利用拼接结果设计 5'RACE 巢式 PCR 引物(表 1),按照同样程序获得 *AaHMGRs* 的 5'RACE,并拼接获得 *AaHMGRs* 的电子全长,用 PCR 扩增获得 *AaHMGRs* 的物理全长。

表 1 基因克隆相关引物

引物名称	类型	引物序列 (5'-3')	
<i>HMGR</i> 1-3	3'-RACE	1-ACTGGTGATAATGATGATGGTA	2-ACAGATCAAGCAGAGACATGTC
<i>HMGR</i> 2-3	3'-RACE	1-CAGTCACCATGCCTTCAATC	2-CAACTACTTCTGTTCCTCTCC
<i>HMGR</i> 3-3	3'-RACE	1-TAGATTGTGAGTCAGATGTGGTC	2-TCTTGATGGTTTGCTCTAGAG
<i>HMGR</i> 1-5	5'-RACE	1-GATCTTGTCGCGCCATCTGTGA	2-GTAATGGTAATGCGTCTGAGGCT
<i>HMGR</i> 2-5	5'-RACE	1-CGAGTTTCGCCATTCATGGATGT	2-CGAGTTTCGCCATTCATGGATGT
<i>HMGR</i> 3-5	5'-RACE	1-CCAAGCTTGGATTCCAACGAGT	2-CCACAAGAGCTCACACGACTGT
M13	3'-RACE	GTTTTCCCAGTCACGAC	
UPM/NUP	5'-RACE	U-CTAATACGACTCACTATAGGGC	N-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAG

### 1.3 生物信息学分析

通过 Vector NTI suite 11.5 软件进行 CDS 的查找和翻译,在 NCBI 网站的 BLAST 进行核酸和氨基酸序列比对;用 ClustalX 软件进行氨基酸序列多重比对,用 MEGA4.1 的 Neighbor-joining 进行进化树的构建。蛋白质的基本性质在 ExPASy 网站在线分析。

### 1.4 表达分析

根据获得的 *AaHMGRs* 利用 Beacon designer 软件设计荧光定量特异性引物(表 2),EF1 $\alpha$  为内参基因,用染料 iTaq<sup>TM</sup> Universal SYBR<sup>®</sup> Green Supermix 通过 iQ5 cycler 荧光定量 PCR 仪反应并根据  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算得到 *AaHMGRs* 的相对表达量,反应的条件为:预熔解 95 °C 2 min,熔解 95 °C 15 s,退火 58.2 °C 20 s,72 °C 延伸 20 s,循环 40 次,熔解曲线,55~95 °C,80 个循环,每循环升温 0.5 °C(Liu et al)。

表 2 基因表达分析引物

引物名称	引物序列 (5'-3')F	引物序列 (5'-3')R
<i>HMGR</i> 1RT	ACTGGTGATAATGATGATGGTA	TATCTTAGCCGCTCTATAACAA
<i>HMGR</i> 2 RT	CAATCTATCATCCGTTCTTC	AGAGATAATGTGAGGAATCA
<i>HMGR</i> 3RT	ATACAACCGCTCCACCAG	ACCAGAAGAAGAACAAGAACAC
EF1 $\alpha$	GACCTACTCTCCTTGAAG	GTTCCAATACCACCAATC

## 2 结果与分析

### 2.1 *AaHMGRs* 全长 cDNA 克隆

本研究克隆获得 3 条青蒿 *HMGR* 基因全长 cDNA, 结果显示: *AaHMGR1* 全长 2 053 bp, 包含 268 bp 的 3'UTR, 81 bp 的 5'UTR 和 1 704 bp 的 CDS, 编码 1 个 568 个氨基酸残基的多肽; *AaHMGR2* 全长 2 285 bp, 包含 467 bp 的 3'UTR, 63 bp 的 5'UTR 和 1 755 bp 的 CDS, 编码 585 个氨基酸残基的多肽; *AaHMGR3* 全长 2 116 bp, 包含 247 bp 的 3'UTR, 132 bp 的 5'UTR 和 1 737 bp 的 CDS, 编码 579 个氨基酸残基的多肽. *AaHMGR1* 和 *AaHMGR2* 的 cDNA 相似度为 62.4%, *AaHMGR1* 和 *AaHMGR3* 的 cDNA 相似度为 61.1%, 而 *AaHMGR2* 和 *AaHMGR3* 的 cDNA 相似度为 66.1%, 说明这 3 条 *AaHMGR* 是不同的序列. 再将其 cDNA 与青蒿基因组对比后发现这 3 条 *AaHMGR* 均能够找到对应的基因组序列, 它们编码区的基因组结构不同(图 1). *AaHMGR1* 和 *AaHMGR2* 结构相似, 都具有 4 个外显子和 3 个内含子, 但是外显子长度略有差异. *AaHMGR3* 只有 1 个外显和 2 个内含子. 这 3 条 *AaHMGR* 在 cDNA 的 3'UTR, 5'UTR、编码区和基因组序列上均有较大差异, 表明是 3 条不同的 *HMGR* 基因.

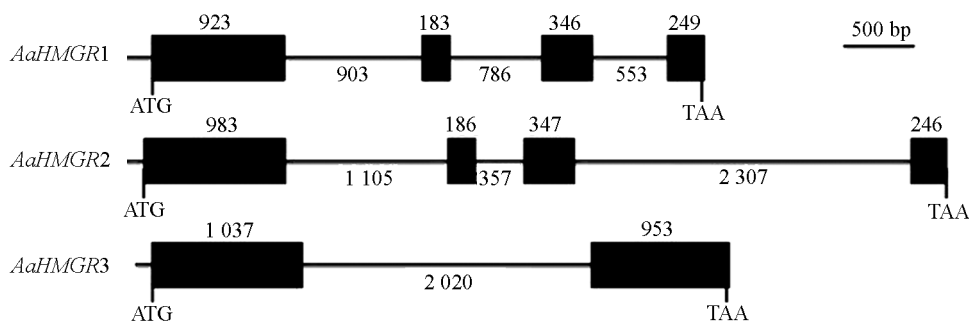


图 1 *AaHMGRs* 基因 DNA 结构

### 2.2 青蒿 *HMGR* 生物信息学分析

BLASTP 分析结果表明这 3 条 *AaHMGR* 报道的 *HMGR* 具有较高相似性, 属于 *HMGR* 类蛋白质. 这 3 条 *AaHMGR* 在氨基酸序列上高度相似, 且具有十分接近的分子量和等电点(表 3). 在 3 条 *AaHMGR* 中, 均能够找到 2 个 HMG-CoA 结合基序和两个 NADP(H) 结合基序. 氨基酸序列多重比对结果(图 2)显示: 本研究克隆获得的 *AaHMGRs* 与其他物种的 *HMGR* 具有较高同源性, *AaHMGR1* 与杜仲(AAV54051)、胡黄连(ABC74565)的相似性分别为 73.3%, 75%, *AaHMGR2* 与长春花(AAT52222)的相似性为 71.3%, *AaHMGR3* 与穿心莲(AAL28015)的相似性为 68.1%, 该结果与之前的研究结果相一致<sup>[9]</sup>. 从氨基酸的多重比对结果可以确认本研究所克隆的 3 条序列均为 *HMGR*. 利用 MEGA4.0 Neighbor-joining 方法构建进化树. 结果显示: 在进化关系上, *AaHMGRs* 属于植物 *HMGR* 家族, *AaHMGR1* 单独被分在一支, 与已报道的青蒿的 *HMGR*(AAD47596)属于同一条<sup>[8]</sup>, 这个结果与氨基酸的多重比对结果一致, 而 *AaHMGR2*, *AaHMGR3* 则位于进化树的同一分支上, 与 *AaHMGR1* 的亲缘关系较远(图 3).

表 3 *HMGR* 生物信息学分析

蛋白	分子量	等电点 pI	HMG-CoA 结合基序	NADP(H)结合基序
<i>AaHMGR1</i>	61.1 kDa	6.52		
<i>AaHMGR2</i>	62.9 kDa	6.58	EMPIGYVQIP TTEGCLVA	DAMGMNM GTVGGGT
<i>AaHMGR3</i>	62.4 kDa	6.08		

### 2.3 *AaHMGRs* 表达分析

虽然基因家族不同成员编码同一类蛋白质而具有相同的蛋白质功能, 但是家族成员可以通过基因表达的不同时空特异性进行分工. 我们采用 qPCR 分析了这 3 个 *AaHMGR* 组织表达谱、对 MeJA 和机械损伤的响应, 从而初步探讨它们的不同分工.

		*****
Andrographispaniculata	(228)	GFNYDA ILGQCCEMPVGVYVQIPVGIAGPILLDGREYSVPMATTEGCLVASTNRGCKAIIA
Catharanthusroseus	(230)	GFDYAS ILGQCCEMPVGVYVQIPVGIAGPILLDGREYMLPMATTEGCLVASTNRGCKAIIA
Eucommiaulmoides	(225)	GFDYEA ILGQCCEMPVGVYVQIPVGIAGPILLNCGEYSVPMATTEGCLVASTNRGCKAIYA
Picrorhizakurrooa	(197)	GFDYES ILGQCCEMPVGIAGPILLNCGEYSVPMATTEGCLVASTNRGCKAIYA
Artemisia annua	(201)	GFDYES ILGQCCEMPVGVYVQIPVGIAGPILLNCGEYFVPMATTEGCLVASTNRGCKAICL
AaHMGR1	(202)	GFDYES ILGQCCEMPVGVYVQIPVGIAGPILLNCGEYFVPMATTEGCLVASTNRGCKAICL
AaHMGR2	(220)	GFDYES ILGQCCEMPVGVYVQIPVGIAGPILLNCGEYFVPMATTEGCLVASTNRGCKAIVV
AaHMGR3	(216)	GFDYES ILGQCCEMPVGVYVQIPVGIAGPILLDCEYFVPMATTEGCLVASTNRGCKAIVV
Consensus	(241)	GFDYES ILGQCCEMPVGVYVQIPVGIAGPILLNCGEYFVPMATTEGCLVASTNRGCKAIIYA
		*****
Andrographispaniculata	(348)	CAVAGKNLYIRFSCSTGDAMGMNMVSKGVQNVLDLFLGNEFSDMEVIGLSGNYCSDKKPAA
Catharanthusroseus	(350)	CAIAGKNLYIRFSCSTGDAMGMNMVSKGVQNVLEFLQTDYFDMDVGLISGNFCADKKPAA
Eucommiaulmoides	(345)	CSLAGKNLYIRFSCSTGDAMGMNMVSKGVQNVLEFLQNDFFDMVIGISGNFCSDKKPAA
Picrorhizakurrooa	(317)	CGIAGKNLYIRFSCSTGDAMGMNMVSKGVQNVLDLFLQNDFFDMVIGISGNFCSDKKPAA
Artemisia annua	(321)	CSLAGKNLYIRFSCSTGDAMGMNMVSKGVQNVLDLFLQNDFFDMVIGISWKFCSDDKKPAA
AaHMGR1	(322)	CSLAGKNLYIRFSCSTGDAMGMNMVSKGVQNVLDLFLQNDFFDMVIGISGNFCSDKKPAA
AaHMGR2	(340)	CAIAGKNLYIRFSCSTGDAMGMNMVSKGVQNVLDLHSDFFDMVIGISGNFCSDKKPAA
AaHMGR3	(336)	CAIAGKNLYIRFSCSTGDAMGMNMVSKGVQNVLDLFLQADFFDMVIGISGNFCSDKKPAA
Consensus	(361)	CAIAGKNLYIRFSCSTGDAMGMNMVSKGVQNVLDLFLQNDFFDMVIGISGNFCSDKKPAA
		*****
Andrographispaniculata	(468)	LVSAYV IATGQDPAQNI ESSHCITMMEAVNDGKDLHISVTMPSIEVGVGGGTQLASQSA
Catharanthusroseus	(470)	IVSAIF IATGQDPAQNI ESSHCITMMEAVNDGKDLHISVTMPAIEVGVGGGTQLASQSA
Eucommiaulmoides	(465)	IVSAVF IATGQDPAQNI ESSHCITMMEAVNDGKDLHISVTMPSIEVGVGGGTQLASQSA
Picrorhizakurrooa	(437)	IVSAIF IATGQDPAQNI ESSHCITMMEAVNDGKDLHISVTMPSIEVGVGGGTQLASQSA
Artemisia annua	(441)	IVSAVF IATGQDPAQNI ESSHCITMMEAVNNGKDLHISVTMPSIEVGVGGGTQLASQSA
AaHMGR1	(442)	IVSAVF IATGQDPAQNI ESSHCITMMEAVNNGKDLHISVTMPSIEVGVGGGTQLASQSA
AaHMGR2	(460)	IVSAVYLATGQDPAQNI ESSHCITMMEAVNDGKDLHISVTMPSIEVGVGGGTQLASQSA
AaHMGR3	(456)	IVSAVYLATGQDPAQNI ESSHCITMMEAVNEGKDLHISVTMPSIEVGVGGGTQLASQSA
Consensus	(481)	IVSAVF IATGQDPAQNI ESSHCITMMEAVNDGKDLHISVTMPSIEVGVGGGTQLASQSA

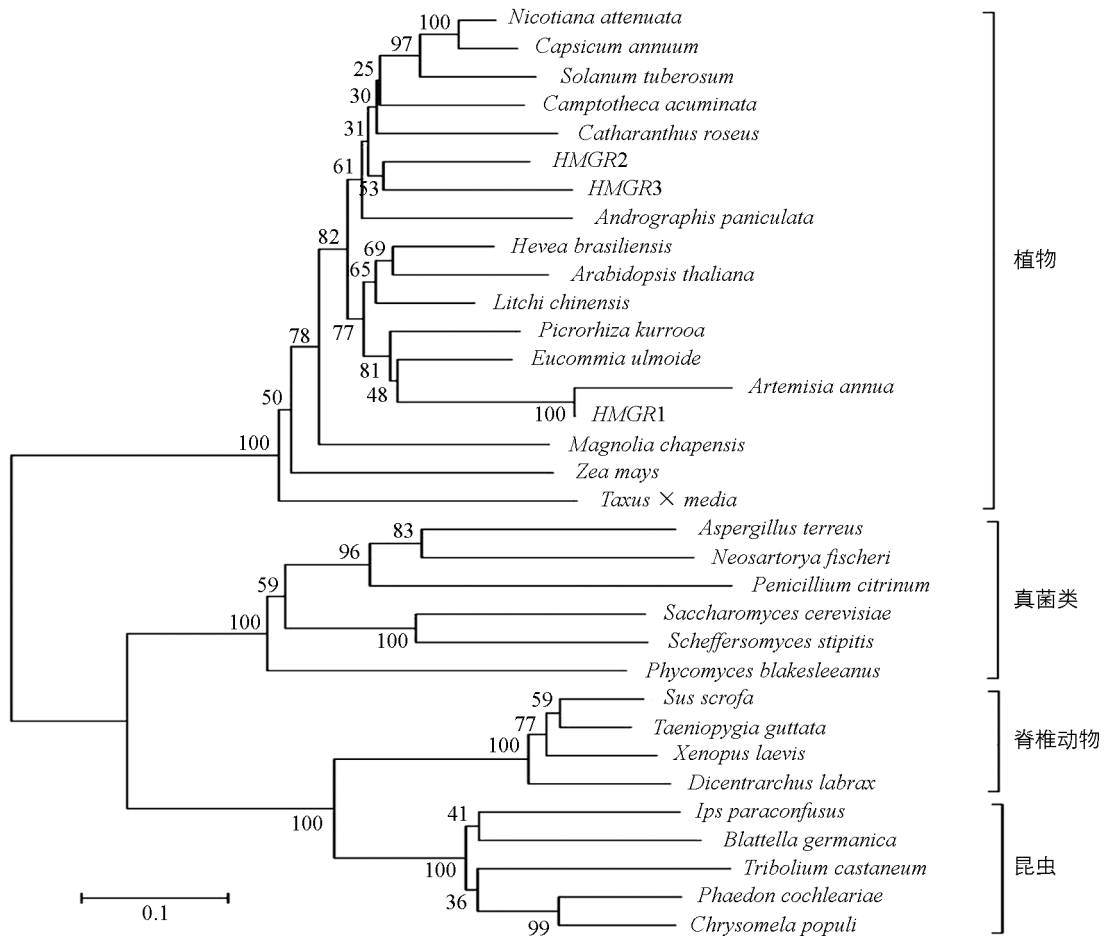
图 2 AaHMGRs 和其他物种的氨基酸序列多重比对图

分析 3 个 *HMGR* 在青蒿的组织中相对表达量, 结果显示: *AaHMGR1* 只在青蒿地上部分表达, 在根中不表达, 在茎中表达量高于叶和花中表达量. 而 *AaHMGR2* 和 *AaHMGR3* 在花中相对表达量最高(图 4). 结果表明, *AaHMGR1*, *AaHMGR2*, *AaHMGR3* 在植物组织中表达模式有差异, 推测 3 条 *HMGR* 在青蒿中的功能不一样.

分析 MeJA 处理后青蒿的 3 个 *HMGR* 的表达水平, 结果表明: 3 个 *AaHMGR* 对 MeJA 处理均有响应, 但其响应模式存在较大的差异. *AaHMGR1* 对 MeJA 处理响应比较迅速, 处理后 0.5 h 其表达量就达到最大值, 其后逐渐下降. 而且 0.5 h 和 1 h 时基因表达量上调, 且对照相比均呈现差异有统计学意义 ( $p < 0.01$ ), 是对照的 12.95 倍和 10.02 倍. 这个结果与已报道的研究结果相符<sup>[10]</sup>. 用 MeJA 处理青蒿并检测 *HMGR* (AF142473) 的表达量及青蒿素的含量, 结果显示 *HMGR* 的表达量在处理 1 h 后显著提高, 并且青蒿素的含量在 1 h 后也相应提高, 暗示 *HMGR* 可能参与青蒿素的合成. *AaHMGR2* 在 MeJA 处理后, 相对表达量整体呈现逐渐上升的趋势, 但是其响应的的时间则没有 *AaHMGR1* 迅速, 6 h 时其表达量的上调幅度与对照相比差异达到统计学意义 ( $p < 0.01$ ). *AaHMGR3* 在 MeJA 处理后, 相对表达量整体轻微响应, 3h 时达到最大值, 是对照的 2.71 倍 ( $p < 0.01$ ) (图 5). 结果表明, *AaHMGR1*, *AaHMGR2*, *AaHMGR3* 均受 MeJA 的诱导, 但 *AaHMGR1* 的响应更强烈迅速, 因此推测 *AaHMGR1* 可能直接参与青蒿素的合成.

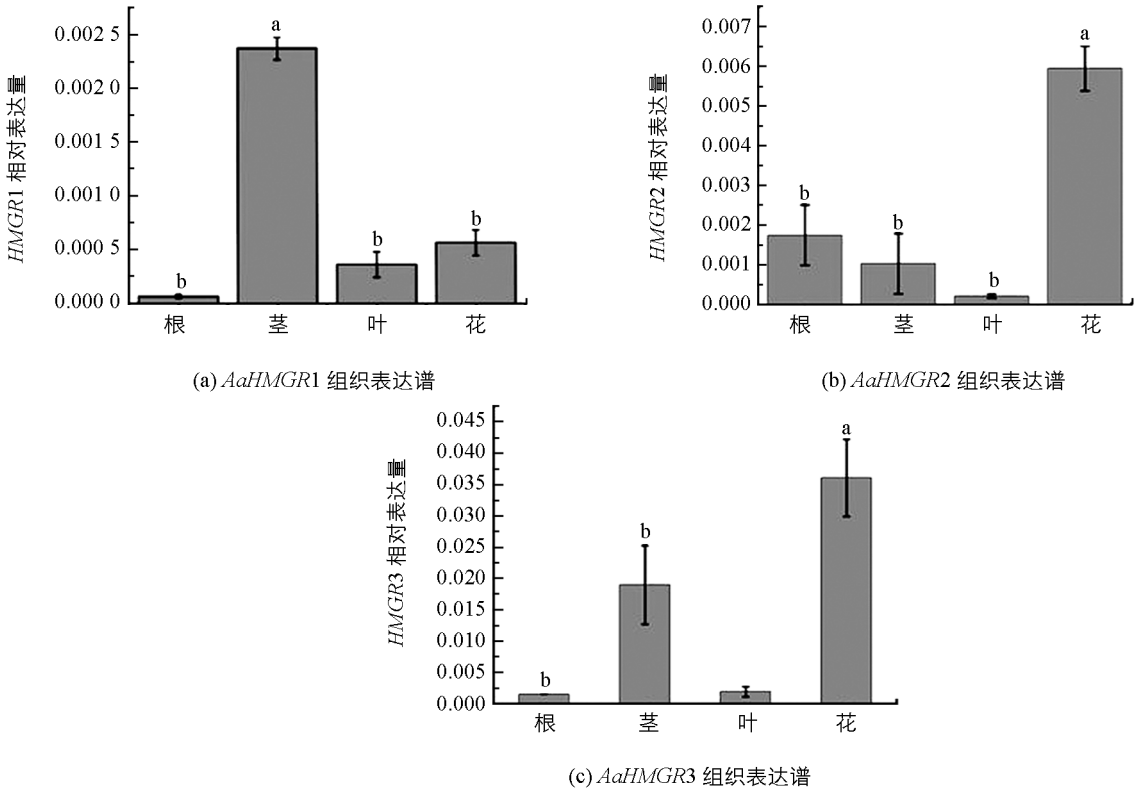
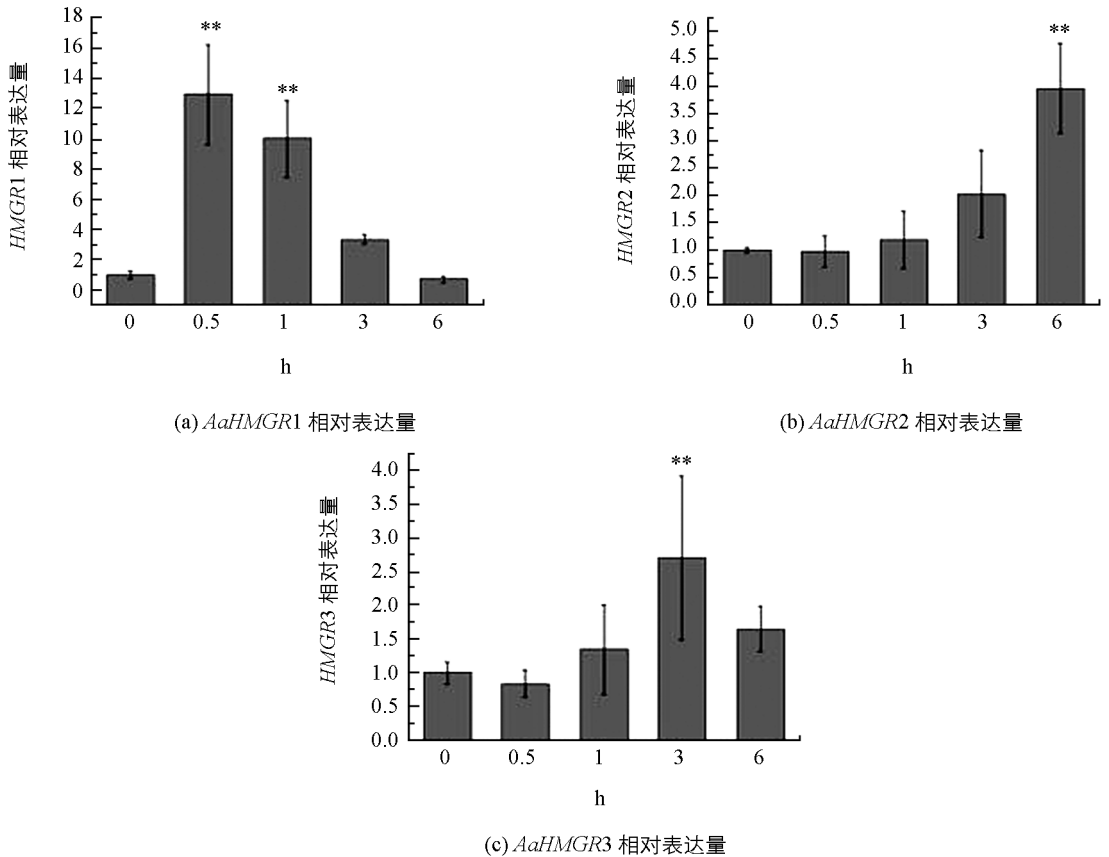
青蒿的 *HMGR* 家族基因在损伤处理后的基因表达情况显示: 青蒿的 3 条 *HMGR* 均对损伤处理有不同程度的响应. *AaHMGR1* 在损伤处理后, 在 3h 时达到最大值, 是对照的 724 倍 ( $p < 0.01$ ), 其后在 6 h 时表达量有所下降, 这个结果与先前的研究 Liu 等<sup>[13]</sup> 结果相似. 而 *AaHMGR2* 和 *AaHMGR3* 基因在损伤处理后表达模式基本一致, 呈现波动式的变化. 仅从最大表达量来看 3 个基因具有一致性, 都是在 3h 达到最大值, 但是上调幅度却不同, *AaHMGR1* 上调幅度较大. 由此可知, *AaHMGR1*, *AaHMGR2*, *AaHMGR3* 均受损伤诱导, 但是 *AaHMGR1* 的响应更强烈(图 6). 因此推测 *AaHMGR1* 可能在青蒿素的生物合成途径中起着更为重要的作用.



图 3 相关物种 *HMGRs* 的进化树

### 3 讨论

本研究获得的 *AaHMGR1*, *AaHMGR2*, *AaHMGR3* 与其它已经报道的植物 *HMGR* 具有高度同源性, 且均包含有 *HMGR* 所特有的 HMG-CoA 和 NADP(H) 保守结构域<sup>[9]</sup>. 3 条 *HMGR* 的 DNA 结构不相同, 且在组织中表达中 *AaHMGR1* 在茎中表达最高, 而 *AaHMGR2* 和 *AaHMGR3* 在花中表达最高, 说明 *AaHMGR2* 和 *AaHMGR3* 的本底水平表达比 *AaHMGR1* 高, 更进一步说明可能在激素或损伤诱导时 *AaHMGR1* 更有利于青蒿素生物合成. 实验结果显示在 MeJA 和损伤处理后 *AaHMGRs* 基因的响应模式确有统计学差异, *AaHMGRs* 基因受 MeJA 和损伤诱导, 特别是受损伤诱导, 与先前的研究结果一致: Liu 等<sup>[13]</sup> 用损伤处理青蒿后检测 *HMGR* (AF142473) 的表达量及青蒿素含量, 在处理后 *HMGR* 基因表达量在 2h 达到最大值, 青蒿素含量在 2h 后显著提高并在 4h 时达到最大值. 可利用损伤青蒿作为提高青蒿素的有效方法之一. MeJA 在短时间处理后, *AaHMGR1* 的表达量显著提高, 结果与 Xiang<sup>[10]</sup> 的研究结果相一致, 可考虑尝试利用 *AaHMGR1* 来提高青蒿素的生物合成. 青蒿素的含量在 MeJA 处理后也得到显著提高, 这可能是 MeJA 的处理, 激活了参与信号转导同时参与青蒿素合成的转录因子的表达, 从而进一步引起下游参与青蒿素合成的基因的表达, 最终导致青蒿素含量的提高. 目前研究发现很多转录因子均参与 MeJA 的信号转导, 并启动下游基因的表达<sup>[11]</sup>. 损伤处理后, *AaHMGR1* 的表达量和青蒿素的含量显著提高, 这可能是处理后, 诱导了参与损伤信号转导同时也参与青蒿素合成的转录因子表达, 从而进一步引起下游参与青蒿素合成的基因的表达, 最终导致青蒿素含量的提高. 但是关于损伤所涉及的转录因子的研究还较少, 因此这方面的研究还需要再深入, 探寻其提高青蒿素含量的分子机制.

图 4 *AaHMGRs* 在组织中相对表达量图 5 青蒿的 *AaHMGRs* 在 MeJA 诱导的相对表达量

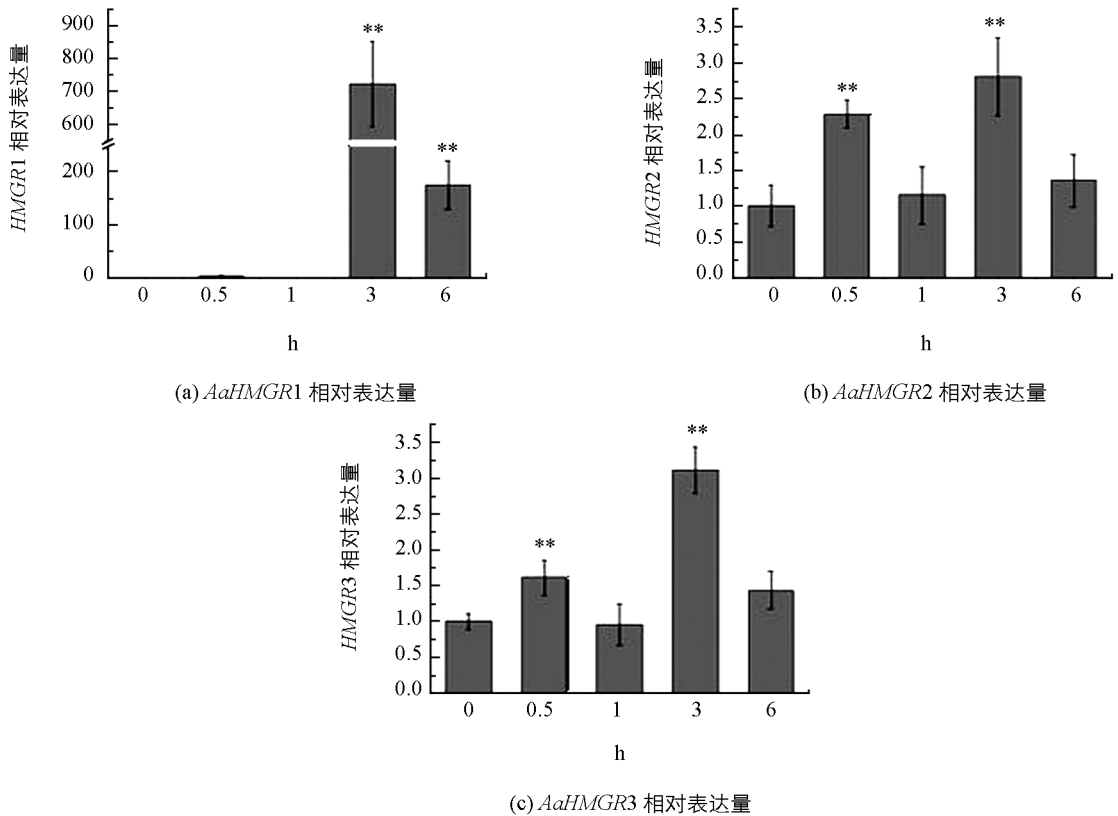


图 6 青蒿的 *AaHMGRs* 在 Wounding 诱导的相对表达量

#### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [2] FAUTH, MOHANTY S. Guidelines for the Treatment of Malaria [J]. World Health Organization, 2006, 6(2): 632–646.
- [3] WANG Y Y, JING F Y, YU S Y, et al. Co-Overexpression of the HMGR and FPS Genes Enhances Artemisinin Content in *Artemisia annua* L. [J]. J Med Plant Res, 2011, 5(15): 3396–3403.
- [4] HALE V, KEASLING J D, RENNINGER N, et al. Microbially Derived Artemisinin; A Biotechnology Solution to the Global Problem of Access to Affordable Antimalarial Drugs [J]. Am J Trop Med Hyg, 2007, 77(6 Suppl): 198–202.
- [5] LIU B, WANG H, DU Z, et al. Metabolic Engineering of Artemisinin Biosynthesis in *Artemisia annua* L. [J]. Plant Cell Rep, 2011, 30(5): 689–694.
- [6] RO D K, PARADISE E M, OUELLET M, et al. Production of the Antimalarial Drug Precursor Artemisinic Acid in Engineered Yeast [J]. Nature, 2006, 440(7086): 940–943.
- [7] HARKER M, HOLMBERG N, CLAYTON J C, et al. Enhancement of Seed Phytosterol Levels by Expression of an N-Terminal Truncated Hevea Brasiliensis (Rubber tree) 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase [J]. Plant Biotechnol J, 2003, 1(2): 113–121.
- [8] AQUIL S, HUSAINI A M, ABDIN 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(13): 1453–1458.
- [9] LIAO Z H, TAN Q M, CHAI Y R, et al. Cloning and Characterisation of the Gene Encoding HMG-CoA Reductase from *Taxus Media* and Its Functional Identification in Yeast [J]. Functional Plant Biology, 2004, 31(1): 785–801.
- [10] XIANG L E, ZHU S Q, ZHAO T F, et al. Enhancement of Artemisinin Content and Relative Expression of Genes of Artemisinin Biosynthesis in *Artemisia annua* by Exogenous MeJA Treatment [J]. Plant Growth Regulation; 2014, 75(2): 435–441.
- [11] BOTER M. Conserved MYC Transcription Factors Play a Key Role in Jasmonate Signaling Both in Tomato and Arabi-

dopsis [J]. *Genes Dev*, 2004, 18(13): 1577–1591.

- [12] WANG H H, MA C F, LI Z Q, et al. Effects of Exogenous Methyl Jasmonate on Artemisinin Biosynthesis and Secondary Metabolites in *Artemisia annua* L. [J]. *Industrial Crops and Products*, 2010, 31(2): 214–218.
- [13] LIU D H, ZHANG L D, LI C X, et al. Effect of Wounding on Gene Expression Involved in Artemisinin Biosynthesis and Artemisinin Production in *Artemisia annua* [J]. *Russ J Plant Physiol*, 2010, 57(6): 882–886.

## Molecular Cloning and Expression Analysis of HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA) Reductase Gene Family Upon MeJA and Mechanical Injury Treatments in *Artemisia annua* L.

CHEN Yu-pei<sup>1</sup>, SHEN Tian<sup>1,2</sup>, QIU Fei<sup>1</sup>,  
CHEN Min<sup>3</sup>, LIAO Zhi-hua<sup>1</sup>, LAN Xiao-zhong<sup>4</sup>, YANG Chun-xian<sup>1</sup>

1. Key Laboratory of the Ministry of education of the ecological environment of the Three Gorges Reservoir Area / Chongqing Engineering and Technology Research Center for Sweet potato, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China;
2. Jiangchuan No. 1 Middle School, Yuxi Yunnan 652600, China;
3. School of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China;
4. School of Food Sciences, Xizang Agricultural and Husbandry College, Linzhi, Tibet 86000, China

**Abstract:** Three full-length cDNA of HMGR, i. e. *AaHMGR1*, *AaHMGR2* and *AaHMGR3*, were cloned from *Artemisia annua*. Bioinformatic and phylogenetic analyses revealed that all the three *AaHMGRs* shared extensive homology with other plant species and belonged to the plant HMGR family; however, the corresponding coding region of the genome structure was different. The expression of *AaHMGR1* was the highest in the stem, while the expression of *AaHMGR2* and *AaHMGR3* was relatively high in the flower. The expression of *AaHMGR1* reached the maximum at 0.5 h after MeJA induction, and then decreased gradually, while *AaHMGR2* and *AaHMGR3* responded but slightly. The expression of *AaHMGR1* increased by about 700 times at 3 h after mechanical injury, while that of *AaHMGR2* and *AaHMGR3* was not significant. The above results suggested that *AaHMGR1* may play a crucial role in artemisinin biosynthesis.

**Key words:** *Artemisia annua*; HMGR; MeJA; wound; artemisinin

责任编辑 包 颖



