

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201409048

王毅,周旭,毕玮,等. 思茅松 *HDR* 基因全长 cDNA 克隆与序列分析[J]. 广西植物, 2015, 35(5):721—727Wang Y, Zhou X, Bi W, et al. Cloning and sequence analysis of 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase gene cDNA from *Pinus kesiya* var. *langbianensis*[J]. Guihaia, 2015, 35(5):721—727

思茅松 *HDR* 基因全长 cDNA 克隆与序列分析

王毅^{1,2}, 周旭³, 毕玮^{1,2}, 杨宇明², 李江², 王娟^{2*}

(1. 云南林业科学院 国家林业局云南珍稀濒危森林植物繁育和保护重点实验室, 昆明 650201; 2. 云南林业科学院, 云南省森林植物培育与开发利用重点实验室, 昆明 650201; 3. 西南林业大学, 昆明 650224)

摘要: 1-羟基-2-甲基-2-E-丁烯基-4-焦磷酸还原酶(*HDR*)是甲基-D-赤藓醇-4-磷酸(*MEP*)途径中的最后一个酶,在植物萜类生物合成中起主控作用。该研究根据思茅松(*Pinus kesiya* var. *langbianensis*)树皮转录组数据分析结果,首先获得了思茅松 *HDR* 基因片段,然后根据所获得的基因片段设计特异引物,提取受伤后的思茅松树皮的 RNA,并运用 RT-PCR 和 RACE 技术从思茅松树皮中克隆得到完整的 *HDR* 基因(*PkHDR*)。生物信息学分析表明:克隆获得的 *PkHDR1* 基因 cDNA 全长序列为 1 876 bp,含有 1 个 1 464 bp 的开放阅读框(ORF),编码 487 个氨基酸。同源性分析结果表明:思茅松 *HDR* 蛋白与赤松(*Pinus densiflora*) *HDR* 蛋白的相似性高达 99%。亚细胞定位及结构域分析结果表明:思茅松 *PkHDR* 氨基酸序列中包含转运肽序列(A1-A61)及植物 *HDR* 蛋白多个保守的功能位点(A143, A234, A288, A371)。系统进化分析结果表明:*PkHDR* 蛋白与赤松 *HDR* 蛋白的亲缘关系最为接近。半定量 PCR 检测结果表明:树皮的创伤促进思茅松 *HDR* 基因的表达。该研究成功克隆获得 *HDR* 基因,并确定其与松脂代谢密切相关,为阐明思茅松松脂生物合成机制和分子育种提供了参考。

关键词: 思茅松; *HDR*; cDNA 克隆; 基因功能分析; 半定量 PCR**中图分类号:** Q943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2015)05-0721-07

Cloning and sequence analysis of 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase gene cDNA from *Pinus kesiya* var. *langbianensis*

WANG Yi^{1,2}, ZHOU Xu³, BI Wei^{1,2}, YANG Yu-Ming²,
LI Jiang², WANG Juan^{2*}

(1. Key Laboratory of Rare and Endangered Forest Plants of State Forestry Administration, Yunnan Academy of Forestry, Kunming 650204, China; 2. Key Laboratory of Forestry Plant Cultivation and Utilization, Yunnan Academy of Forestry, Kunming 650204, China; 3. Faculty of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming 650204, China)

Abstract: 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase(*HDR*) catalyzes the last step of the 2C-methyl-D-erythritol-4-phosphate (*MEP*) pathway, 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase plays an important role in regulation of terpenes biosynthesis. To explore the function of 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase in *Pinus kesiya* var. *langbianensis*, and to study the role of 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-

收稿日期: 2014-11-25 **修回日期:** 2015-03-30**基金项目:** 国家林业公益性行业科研专项(201304105); 云南省应用基础研究重点项目(2013FA054); 云南省中青年学术技术带头人后备人才培养项目(2010CI016)。**作者简介:** 王毅(1981-),男,四川广安人,博士,助理研究员,主要从事植物学和分子生物学研究,(E-mail)22825818@qq.com。**通讯作者:** 王娟,博士,教授,长期从事生物多样性保护和竹类植物的微观研究,(E-mail)schima@163.com。

4-diphosphate reductase in regulation of resin biosynthesis, the transcriptome of bark of *Pinus kesiya* var. *langbianensis* was sequenced by Next-Generation Sequencing. First, a fragment of 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase gene was obtained from *Pinus kesiya* var. *langbianensis* transcriptome after gene assemble and gene function annotation. The special primers were designed according to the fragment of 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase. RNA of injured bark was extracted by Trizol method. The full length gene of *PkHDR* was cloned from *Pinus kesiya* var. *langbianensis* by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and rapid-amplification of cDNA ends (RACE). Bioinformation analysis showed that the obtained full cDNA sequence of *PkHDR* had 1 876 bp. It was consisted of 1 464 bp open reading frame (ORF) which encoded 487 amino acid. Homology analysis indicated that the deduced *PkHDR* protein shared 99% identities with the 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase came from *Pinus densiflora*. Subcellular localization and structural domain analysis showed that the transit peptide sequence (A1-A61) and multiple conserved functional sites (A143, A234, A288, A371) of plant HDR protein were found in the deduced coding sequence of *PKHDR*. Phylogenetic analysis revealed that the evolutionary relationship of *PkHDR* protein was the closest to *Pinus densiflora* HDR protein. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) detection showed that *PkHDR* gene expression was up-regulated by wounding treatment. The full cDNA of *PkHDR* from *Pinus kesiya* var. *langbianensis* was cloned and the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) showed that *PkHDR* was involved in regulation of resin biosynthesis in *Pinus kesiya* var. *langbianensis*. These results would provide important information to reveal the resin biosynthesis in *Pinus kesiya* var. *langbianensis*. And this study also can be applied in the research of the high yield of resin variety molecular breeding.

Key words: *Pinus kesiya* var. *langbianensis*; 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase gene; cDNA clone; gene function analysis; RT-PCR

松脂是重要的化工原料,其挥发性单萜和挥发性倍半萜以及非挥发性的二萜广泛应用于化学,食品和医药等领域(Bohlmann *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2013)。思茅松(*Pinus kesiya* var. *langbianensis*)是云南省最主要产脂树种之一,其主要分布在云南省普洱地区,具有生长快、松脂产量高等优点(徐明艳等, 2012)。在生产实践中发现思茅松个体松脂产量差异显著,单株年产量一般 3 kg,最高可达 140 kg(徐明艳等, 2012)。这意味着思茅松单位面积产脂量有巨大的提升空间。我国自 20 世纪 80 年代始开展思茅松遗传改良研究,在种源试验、优良林分选择、优树收集、无性系种子园建设、半同胞子代测定、早晚期性状相关及遗传变异等方面开展了研究(张文勇等, 2010)。姜远标等(2007)尝试利用现代分子标记辅助思茅松高产脂育种。但目前对思茅松松脂代谢过程中关键酶的研究尚未见有报道。

所有萜类化合物,包括思茅松松脂主要成分都是以异戊烯基焦磷酸(IPP)和二甲基烯丙基焦磷酸(DMAPP)为初始底物,在异戊二烯转移酶(FPP, GPP, GGPP)作用下生成萜类化合物的各种前体,在萜烯合酶作用下生成单萜、二萜、倍半萜等(Tholl, 2006)。IPP 和 DMAPP 可以通过两个代谢

途径独立合成,即位于细胞质中的甲羟戊酸(MVA)途径和位于质体中的甲基-D-赤藓醇-4-磷酸途径(MEP)。其中,MEP 途径的最终产物通常是单萜、二萜和四萜类化合物;而 MVA 途径的最终产物通常是倍半萜、三萜类化合物(Laule *et al.*, 2003; Vranová *et al.*, 2013)。李思广等(2008)对思茅松高产脂个体的松脂化学组成特征分析发现思茅松所产松脂中的主要成分为单萜和双萜化合物,而倍半萜的含量不到 2%。因此,MEP 途径对思茅松松脂代谢具有重要意义。

1-羟基-2-甲基-2-E-丁烯基-4-焦磷酸还原酶(HDR)是甲基-D-赤藓醇-4-磷酸(MEP)途径中的最后一个酶,通过在大肠杆菌中超表达蓝细菌和植物中的 *HDR* 基因证明了 HDR 是萜类生物合成的限速酶(Wolff *et al.*, 2003)。相对于 MEP 途径中的另外一个限速酶,脱氧木酮糖-5-磷酸合酶(DXS),HDR 在通过 MEP 途径提供前体的萜类的生物合成中起到主控作用(Botella *et al.*, 2004)。Kim *et al.*(2009)研究赤松松脂代谢时,发现 *HDR* 基因在转录水平的差异影响着赤松松脂的产量。本文通过对思茅松转录组数据分析获得思茅松的 *HDR* 基因序列,利用 RT-PCR 和 RACE 方法获得全长的思茅

松 *HDR* 基因,并通过生物信息学方法对基因序列及推导的氨基酸序列进行分析,为阐明思茅松松脂生物合成机制和分子育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

思茅松树皮采集于云南省普洱市景谷县半坡乡,按当地采松脂步骤,去除粗皮后,将表皮以及形成层部分割下,迅速放入液氮中,并用液氮保存直到 RNA 提取。pESY-T3 克隆试剂盒及感受态细胞均购自北京全式金公司;LA-Taq 酶、以及 Reverse Transcriptase M-MLV 购自大连宝生物公司。

1.2 总 RNA 的抽提

思茅松的树皮、松针、幼枝的 RNA 提取参照 CTAB-LiCl 沉淀法(Azevedo *et al.*, 2003;王雁等, 2011)。改进的地方主要是在对 RNA 中的 DNA 消化,本实验采用膜上消化的方式去除 DNA。方法如下:将溶解的 RNA 用 DEPC 水补足 200 μ L 后,加入 100 μ L 的无水乙醇,混匀后加入 RNA Spin Column(宝生物, RNA 提取试剂盒),按照试剂盒步骤进行 DNA 消化,最终用 30 μ L 洗脱液进行洗脱。

1.3 思茅松 *HDR* 基因的 3'RACE

由于转录组数据分析只得到思茅松 *HDR* 的片段,缺少 3'端的基因序列。因此,首先以思茅松树皮的 RNA 为模板,按照 3'-Full RACE Core Set with PrimeScript RTase(TaKaRa)试剂盒说明书合成 3'端完整的思茅松 cDNA 第一链。根据获得的 *HDR* 基因片段序列设计 3'RACE 引物(表 1),对思茅松 *HDR* 基因片段的 3'基因片段进行克隆。

1.4 cDNA 全长扩增

依据 cDNA 拼接序列,设计 *HDR* 基因特异引物 PkHDF0 和 PkHRR0(表 1),以思茅松树皮的 cDNA 为模板, PkHDF0 和 PkHRR0 为引物,扩增思茅松 *HDR* 基因 cDNA 开放阅读框全长序列。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增的 PCR 产物胶回收后连接到 pEASY-T3 载体中。并测序验证所克隆得到的全长 cDNA。

1.5 思茅松 *HDR* 基因 cDNA 序列及其编码蛋白氨基酸的序列分析

采用 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Blast 工具和 DNAMAN 软件将思茅松 *HDR* 与数

据库中其他植物 *HDR* 基因进行核酸和氨基酸的同源序列比对,多序列的比对由 ClusterW 程序完成。并用 MEGA 4.0.2 软件的邻位相连算法(Neighbor-joining)1000 次自检举(boot straping)绘制出进化树图像。TargetP(www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/)和 ChloroP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>)被用来预测 PkHDR 蛋白的亚细胞定位以及叶绿体转运肽的切割位点。

1.6 思茅松 *HDR* 基因表达分析

以获得的 *PkHDR* 基因序列为模板设计特异引物 FHDRt 和 RHDRt(表 1)。将样品液氮研磨后,用 CTAB 法分别提取思茅松的树皮 1(除去粗皮后立即取样),树皮 2(除去粗皮后 12 h 取样,树皮 3(除去粗皮后 24 h 取样),树皮 4(除去粗皮后 36 h 取样)。并用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量后,将 RNA 保存在-80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱。cDNA 合成参照 Reverse Transcriptase M-MLV 试剂盒说明书操作(宝生物工程有限公司,大连),将 cDNA 保存在-20 $^{\circ}$ C 冰箱。以特异引物 FHDRt 和 RHDRt 检测 PkHDR 基因的表达情况,同时以 actin 为内参。

表 1 文中所用引物序列
Table 1 Primers used in this study

名称 Name	序列(5'~3') Sequence(5'-3')	用途 Purpose
3RACHDRF1	CAATGATGCGTAGATTTGGTGTT	3'RACE
3RACHDRF2	CCACTCAGGAAAGACAAGATGCA	
PkHDF0	ATGGCTCAAGCGTGCGCGGT	全长 cDNA 开放阅读框 克隆
PkHRR0	CTATGCTGCTTGCAGAGCCT	cDNA ORF Clone
FHDFt	ACGTGCAGTGCAAATTGCAT	RT-PCR 检测
RHDRt	ATCAAGCTTCTCCTTTACTA	RT-PCR detection
Factin	ATTGCTGACCGTATGAGCA	RT-PCR 内参
Ractin	TGAATACTAGCTAGCCTCA	RT-PCR control

2 结果与分析

2.1 3'RACE

采用 CTAB 提取结合 LiCl 沉淀法(Azevedo *et al.* 2003;王雁等,2011),提取思茅松树皮以及松针的 RNA,并用膜上消化的方式除去样本中的 DNA,获得完整且纯度高的 RNA(图 1)。

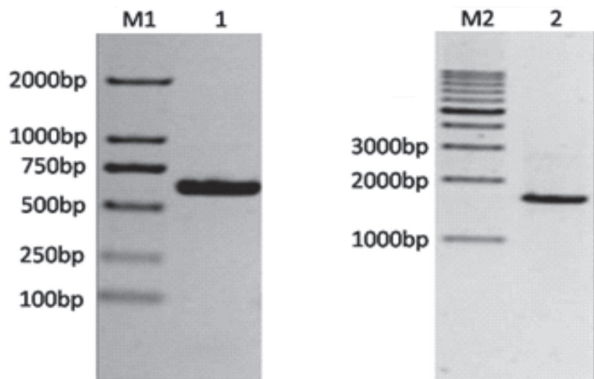


图1 *HDR* 基因克隆 M1. Trans2K DNA Marker; M2. TaKaRa 1K Marker; 1. 3'RACE; 2. *HDR* 全长 ORF 克隆。

Fig. 1 PCR product of *HDR* gene clone M1. Trans2K DNA Marker; M2. TaKaRa 1K Marker; 1. 3'RACE; 2. ORF of *HDR* gene.

2.2 思茅松 *HDR* 全长 cDNA 的克隆与序列分析

通过对思茅松树皮转录组数据分析获得 1 185 bp 大小的 *HDR* 基因片段,根据该片段设计特异引物,用 RACE 技术克隆目的基因的 3' cDNA 末端,并进行测序验证,结果表明其大小为 685 bp (图 1)。

对获得的基因片段序列进行拼接后,获得全长 cDNA 序列为 1 874 bp。利用软件分析获得 cDNA 开放阅读框,并根据该序列设计含有起始密码子的特异引物 PkHDRF0 和含终止密码子的特异引物 PkHDDR0,并以思茅松树皮 cDNA 为模板,PCR 扩增获得 1 464 bp 的 cDNA 完整的开放阅读框,并命名为 PkHDX。将此 1 464 bp 片段与 *HDR* cDNA 拼接序列进行比对分析,分析结果显示两序列一致,这表明思茅松 *HDR* 基因 cDNA 拼接序列正确。其 5' 含有 45 bp 的非编码区,3' 端含有 365 bp 的非编码区,这表明成功克隆获得完整的思茅松 *HDR* 基因的 cDNA 序列 (GenBank Accession No. KM382172)。

2.3 PkHDX 氨基酸序列分析

根据思茅松 *PkHDX* 基因 cDNA 全长序列推测其编码 487 个氨基酸残基,该基因推断的蛋白与赤松 (*Pinus densiflora*) 以及火炬松 (*P. taeda*) *HDR* 蛋白的相似性为 99%。这说明 *HDR* 基因在松科中极其保守。以思茅松 *HDR* 氨基酸序列与其他四种不同物种的 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶氨基酸序列进行序列比对分析,推测出 PkHDX 蛋白具有植物 *HDR* 蛋白催化过程中必需的 4 个半胱氨酸位点 (A143, A234, A288, A371) (图 2)。利用亚细胞定位软件以及叶绿体转运肽的切割位点分析

软件分析显示 PkHDX 的合成位于叶绿体内,其含有一个由 61 个氨基酸残基构成的叶绿体转运肽(切割位点已用箭头标注,图 2)。

2.4 PkHDX 系统进化树分析

思茅松 *HDR* 与其他植物的 *HDR* 氨基酸序列的系统进化分析表明:思茅松 *HDR* 与松科的 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶聚为一类,从系统进化树可以看出思茅松 PkHDX 与赤松的 *HDR* 基因及欧洲云杉 (*Picea abies*) 的 *HDR* 的亲缘关系较近 (图 3)。

2.5 PkHDX 基因的转录模式分析

利用 *PkHDX* 基因的特异引物 FHDXt 和 RHDXt,通过 RT-PCR 检测 PkHDX 在模拟割脂过程中导致思茅松树皮受伤后,随着时间变化 *PkHDX* 基因表达情况。从图 4 看出, *PkHDX* 基因在创伤后 (12、24、36 h) 的表达量明显高于刚刚创伤时 (0 h) 的表达量。这说明对树皮的损伤会刺激 *PkHDX* 基因表达。

3 讨论

思茅松是云南主要的产脂树种,也是中国重要的产脂树种,其树干富含树脂,其松节油平均含量 20%,最高可达 32%,松节油中 β -蒎烯含量高,为全国之最 (徐明艳等, 2012)。在生产实践发现思茅松个体产脂差异巨大,经过多年研究积累确定思茅松个体产脂差异主要源于其个体的遗传性状上的差异 (张文勇等, 2010; 李思广等, 2009)。思茅松生长周期漫长的特性,给传统数量性状的研究带来巨大的挑战。虽然国内已开展无性种子园建设、半同胞子代测定、早晚期性状相关及遗传变异等方面的工作,但并未解决思茅松高产脂机理的问题。大量的图位克隆结果表明数量性状基因座在基因组上往往位于控制其性状的代谢通路上的酶基因上或者附近 (谭震波等, 1996; Mackay *et al.*, 2009; Zorrilla *et al.*, 2011; Induri *et al.*, 2012)。因此,反向数量遗传学研究策略被提出来 (Mauricio, 2001),即从候选基因 (通常是与数量性状相关的代谢通路上的关键基因) 出发,首先确定候选基因与数量性状相关性,再对候选基因上下游序列进行研究,获得数量性状基因座进而阐明数量性状基因调控机理 (Salvi *et al.*, 2005; Longhi *et al.*, 2013)。特别是近年测序技术的飞速发展,从候选基因出发,通过比较基因组上的差异获得大量数量性状基因座 (Harmegnies *et al.*,

[illegible]

Fig. 2 Multiple alignment of deduced amino acid sequences of HDRs: PdHDR, *Pinus densiflora* (ACC54561); PtHDR, *Pinus taeda* (ABO26588); TmHDR, *Taxus media* (ABU44490); GbHDR, *Ginkgo biloba* (ABB78090). Amino acid residues conserved among all sequences are marked with an asterisk; variability between two amino acid residues is marked with a dot. Four conserved cystein residues are highlighted with gray, which supposedly participate in the coordination of the iron-sulfur bridge proposed to be involved in enzymatic catalysis. Dark triangle indicates the putative cleavage site deduced from the alignment result.

1-羟基-2-甲基-2-E-丁烯基-4-焦磷酸还原酶(HDR)是 MEP 途径中的末端酶,催化 1-羟基-2-甲基-2-E-丁烯基-4-焦磷酸(HMBPP)发生还原反应生成 IPP 和 DMAPP。近年通过异源表达以及超表达实验表明 HDR 基因在植物萜类生物合成中有重要作用(Wolff *et al.*, 2003; Botella *et al.*, 2004; 张雯等, 2008)。特别是国外研究人员通过基因表达实验证明 HDR 基因控制着赤松松脂的生物合成(Kim

et al., 2009), 这进一步证明 *HDR* 基因在松脂合成代谢中起着重要作用。通过比对分析发现思茅松 *HDR* 基因与赤松 *HDR* 基因的相似度高达 99%, 只有三个氨基酸的差异(A44, A473, A482), 与火炬松 *HDR* 相似度也高达 98.97%, 只有五个氨基酸的差异(A24, A161, A421, A473, A482)。通过比较思茅松以及已经公布的其他松科植物 MEP 途径中关键酶基因序列也显示出在蛋白序列具有高度保守性。这暗示在松科 MEP 途径相关酶在进化上趋于

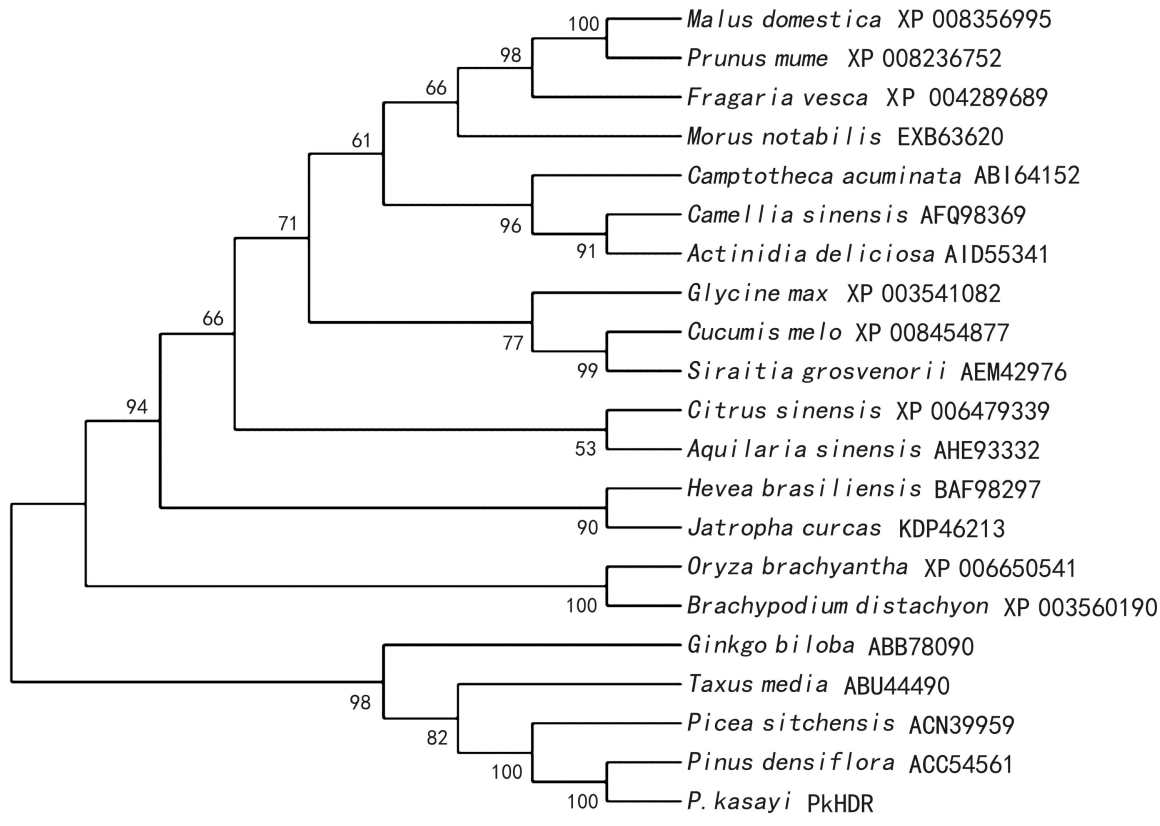


图 3 PkHDR 与其他不同物种间 HDR 系统进化树 邻近相接法构建的系统进化树是用 MEGA4 软件基于已经在 GenBank 里公布的 HDR 构建。

Fig. 3 Phylogenetic tree of the HDRs The neighbor-joining tree was constructed using MEGA4 based on amino acid of 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase which were published on GenBank.

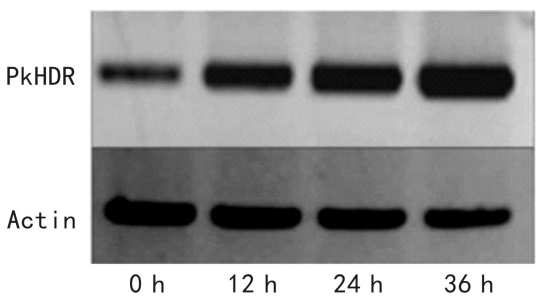


图 4 思茅松 PkHDR 在树皮创伤后表达情况 用特异引物扩增基因片段后,并用 1%琼脂糖胶检测基因转录情况。

Fig. 4 RT-PCR analysis of PkHDR expression after wounding treatment. Transcripts were amplified using gene specific primers, with the PCR products separated using 1% agarose gel.

保守,思茅松个体产脂差异是相关基因在转录水平上的差异导致而不是某个酶活性差异导致。通过 RT-PCR 检测思茅松模拟割脂过程产生创伤后 HDR 表达情况发现,创伤能够有效地刺激 HDR 表达(图 4)。这与生产实践中割脂可以刺激松脂产生相吻合,说明 HDR 表达高低与产脂量正相关。而

对于不同个体在相同处理(创伤)的情况下,表现出不同的产脂量,这很可能与个体中基因拷贝数以及关键酶基因所处染色体位置相关,即所对应的数量性状基因座相关。

本文以普洱市景谷县半坡乡的思茅松“产脂王”(松脂年产量超过 100 kg)为研究对象,首先对其树皮转录组进行测序,然后通过转录组数据分析获得 HDR 基因序列,并利用 RACE 等方法获得思茅松 *PkHDR* 基因全长序列,并将 PkHDR 完整的开放阅读框克隆到载体 pEASY-T3 中。通过生物信息学分析确定其为 1-羟基-2-甲基-2-E-丁烯基-4-焦磷酸还原酶,同时,利用半定量 PCR 确认创伤正调控 *PkHDR* 基因表达,证明其与思茅松松脂合成相关。本研究为未来深入研究思茅松高低产脂机理以及利用 *PkHDR* 基因培育思茅松新品种奠定基础。

参考文献:

Azevedo H,Lino T,Tavares RM. 2003. An improved method for high-quality RNA isolation from needles of adult maritime pine

- trees[J]. *Plant Mol Biol Rep*, **21**(4):333—338
- Bohlmann J, Keeling CI. 2008. Terpenoid biomaterials[J]. *Plant J*, **54**(4):656—669
- Botella P, Besumbes O, Phillips MA, *et al*. 2004. 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*, **40**(2):188—199
- Guggenheim JA, McMahon G, Kemp JP, *et al*. 2013. A genome-wide association study for corneal curvature identifies the platelet-derived growth factor receptor alpha gene as a quantitative trait locus for eye size in white Europeans[J]. *Mol Vis*, **19**(1):243—253
- Harmegnies N, Davin F, De Smet S, *et al*. 2006. Results of a whole-genome quantitative trait locus scan for growth, carcass composition and meat quality in a porcine four-way cross[J]. *Anim gen- et*, **37**(6):543—553
- Induri BR, Ellis DR, Slavov GT, *et al*. 2012. Identification of quantitative trait loci and candidate genes for cadmium tolerance in Populus[J]. *Tree physiol*, **32**(5):626—638
- Jiang YB(姜远标), Wu T(吴涛), Chen SY(陈少瑜). 2007. Optimization of RAPD reaction conditions for *Pinus kesiya* var. *langbianensis*(思茅松 RAPD 反应体系的优化)[J]. *J North-east For*(东北林业大学学报), **35**(9):16—19
- Kim YB, Kim SM, Kang MK, *et al*. 2009. Regulation of resin acid synthesis in *Pinus densiflora* by differential transcription of genes encoding multiple 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase and 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase genes[J]. *Tree Physiol*, **29**(5):737—749
- Laule O, Furholz A, Chang HS, *et al*. 2003. Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proc Natl Sci Acad USA*, **100**(11):6 866—6 871
- Li SG(李思广), Fu YB(付玉斌), Jiang YD(蒋云东). 2008. Chemical compositions of resin from 40 high-resin-yield *Pinus kesiya* var. *langbianensis* clones(40 个高产树脂思茅松无性系的树脂化学组成特征)[J]. *J W Chin For Sci*(西部林业科学), **37**(2):61—65
- Longhi S, Hamblin MT, Trainotti L, *et al*. 2013. A candidate gene based approach validates Md-PG1 as the main responsible for a QTL impacting fruit texture in apple (*Malus x domestica* Borkh)[J]. *BMC Plant Biol*, **13**(1):37
- Mackay TFC, Stone EA, Ayroles JF. 2009. The genetics of quantitative traits: challenges and prospects[J]. *Nat Rev Genet*, **10**(8):565—577
- Mauricio R. 2001. Mapping quantitative trait loci in plants: uses and caveats for evolutionary biology[J]. *Nat Rev Genet*, **2**(5):370—381
- Rodrigues KCDS, Lima JC, Fett AG. 2013. Pine oleoresin: tapping green chemicals, biofuels, food protection, and carbon sequestration from multipurpose trees[J]. *Food Energy Sec*, **1**(2):81—93
- Salvi S, Tuberosa R. 2005. To clone or not to clone plant QTLs: present and future challenges[J]. *Trends Plant Sci*, **10**(6):297—304
- Tan ZP(谭震波), Shen LS(沈利爽). 1996. Identification of QTLs for lengths of the top internodes and other traits in rice and analysis of their genetic effects(水稻上部节间长度等数量性状基因的定位及其遗传效应分析)[J]. *J Gene Genom*(遗传学报), **23**(6):439—446
- Tholl D. 2006. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism[J]. *Curr Opin Plant Biol*, **9**(1):1—8
- Vranová E, Coman D, Grussem W. 2013. Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis[J]. *Ann Rev Plant Biol*, **64**:665—700
- Wang L, Wang A, Huang X, *et al*. 2011. Mapping 49 quantitative trait loci at high resolution through sequencing-based genotyping of rice recombinant inbred lines[J]. *Theor Appl Genet*, **122**(2):327—340
- Wang Y(王雁), Li Z(李贞), Liu XX(刘小侠) *et al*. 2011. A Comparative study on three methods for the extraction of total RNA from *Pinus bungeana*(白皮松总 RNA 3 种提取方法的比较研究)[J]. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学) **39**(23):13 958—13 959
- Wolff M, Seemann M, Bui BTS, *et al*. 2003. Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway: the (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase (LytB/IspH) from *Escherichia coli* is a [4Fe-4S] protein[J]. *FEBS Lett*, **541**(1):115—120
- Xu MY(徐明艳), Deng GX(邓桂香), Ling WG(凌万刚). 2012. Exploration on the utilization of *Pinus khasys* seeds(思茅松良种利用方法的探讨)[J]. *Seed*(种子), **31**(8):95—101
- Zhang W(张雯), Wang YL(王玉亮), Lin J(林娟), *et al*. 2008. Transformation of *Ginkgo biloba* with 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase gene(银杏 1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基-4-焦磷酸还原酶基因(hdr)转化银杏的研究)[J]. *J Fudan*(复旦学报), **47**(5):598—603
- Zhang WY(张文勇), Liu YG(刘永刚). 2010. Research situation and prospects of *Pinus kesiya* var. *langbianensis* plantation(思茅松人工林遗传改良研究现状与展望)[J]. *Guangxi For Sci*(广西林业科学), **39**(2):93—96
- Zorrilla Y, Cabeza A, Domínguez P, *et al*. 2011. Quantitative trait loci and underlying candidate genes controlling agronomical and fruit quality traits in octoploid strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) [J]. *Theor Appl Genet*, **123**(5):755—778