

· 药材与资源 ·

西洋参 *PqGA2ox* 基因的克隆与序列分析

孙同玉, 祝娟, 孙鹏, 廖登群, 李先恩, 祁建军*

中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

摘要: 目的 克隆、分析西洋参 *Panax quinquefolium* 种子萌发过程的赤霉素 2-氧化酶 (gibberellin 2-oxidase, *GA2ox*) 基因。方法 从前期由高通量测序得到 78 207 条 unigenes 基因的注释信息中挖掘出与赤霉素合成和分解代谢相关的基因序列, 得到 11 条 *GA2ox* 基因相关序列, 通过序列比对分析确定 *GA2ox* 的转录本。根据选定的 unigene 序列设计引物, 采用 PCR 方法扩增西洋参 *GA2ox* 的 cDNA 全长; 利用生物信息学方法分析所得基因, 并用实时荧光定量 PCR 技术进行表达分析。结果 得到一条长度为 987 bp, 编码 328 个氨基酸残基的西洋参 *GA2ox* 基因, 命名为 *PqGA2ox*。生物信息学预测 *PqGA2ox* 蛋白不含跨膜区, 不含信号肽, 具有依赖于 2-酮戊二酸和 Fe^{2+} 的双加氧酶超家族的保守结构域。实时荧光定量 PCR 结果显示在形态休眠中期和生理休眠中期的表达量低于其休眠起始期和解除休眠期。结论 首次获得西洋参种子 *PqGA2ox* 基因的编码区序列, 为进一步研究西洋参种子解除休眠的分子机制奠定基础。

关键词: 西洋参; 种子休眠; 萌发; 赤霉素 2-氧化酶; 克隆; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)24-3599-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.24.019

Cloning and sequence analysis of *PqGA2ox* gene in *Panax quinquefolium*

SUN Tong-yu, ZHU Juan, SUN Peng, LIAO Deng-qun, LI Xian-en, QI Jian-jun

Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: Objective To clone and analyze the gibberellin 2-oxidase (*GA2ox*) gene of *Panax quinquefolium* in seed germination. **Methods** Gene sequences about gibberellins synthesis and catabolism were found out from annotation information of 78 207 unigenes obtained by high-throughput sequencing in the early study. Then one transcript coding *GA2ox* was obtained from 11 unigenes related to *GA2ox*. Primers were designed according to selected sequence to get the full-length cDNA of *P. quinquefolium* using PCR method. Predictive analysis and expression analysis of *PqGA2ox* were obtained by bioinformatics and real-time PCR. **Results** A *GA2ox* gene containing 987 bp encoding 328 amino acids was cloned and named as *PqGA2ox*. Bioinformatics analysis showed that *PqGA2ox* had no transmembrane domain or signal peptide, but had the 20G-Fell_Oxy conserved domains. The expression level of *PqGA2ox* was lower in the metaphase of morphological dormancy and physiological dormancy than that in the initial period and release period based on real-time PCR analysis. **Conclusion** The *PqGA2ox* gene from the seeds of *P. quinquefolium* is cloned for the first time, which will provide a foundation for the molecular mechanism of dormancy release of *P. quinquefolium*.

Key words: *Panax quinquefolium* L.; seed dormancy; germination; gibberellin 2-oxidase; cloning; real-time PCR

西洋参 *Panax quinquefolium* L. 为五加科人参属多年生草本植物, 以根入药, 又称花旗参、美国人参等。西洋参是名贵药材, 自我国引种成功后, 目前在吉林、辽宁、黑龙江、山东、河北、山西、陕西、安徽等地已大面积种植^[1]。西洋参通过种子繁殖, 但其种子具有深度休眠特性, 需要长时间的

层积处理完成形态后熟和生理后熟才可以萌发。因此, 研究西洋参种子休眠解除过程的机制就成为关注的热点。

种子休眠是指一个完整的有活力的种子在适合的条件下仍不能完成发芽的现象^[2-3]。Baskin 将种子休眠分为 5 大类: 生理休眠 (physiological

收稿日期: 2014-07-23

作者简介: 孙同玉 (1989—), 女, 河北唐山人, 硕士研究生, 从事药用植物生物技术研究。E-mail: kao20yan12@163.com

*通信作者 祁建军, 男, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 从事药用植物生物技术研究。E-mail: jjqi@implad.ac.cn

dormancy, PD)、形态休眠(morphological dormancy, MD)、形态生理休眠(morphophysiological dormancy, MPD)、物理休眠(physical dormancy, PY)和综合休眠(combination, PY+PD)^[4-5]。西洋参种子的休眠类型属于MPD型。种子休眠与萌发是高等植物长期适应环境因素导致的复杂的适应性特征^[6]。种子休眠与萌发是由多种植物激素,如脱落酸(ABA)、赤霉素(GA)、生长素、乙烯、油菜素内酯调节。内源激素的浓度是由生物合成和失活之间的平衡决定的,并用于调节生理反应^[7]。ABA是休眠诱导和最有可能维持休眠的一个正调节物,但它是发芽的负调节物。GA能够解除休眠,促进发芽和抵消ABA的影响^[8]。在生理休眠的种子,温度和GA可以同时解除休眠和促进发芽^[5,9]。GA在解除休眠和促进萌发中起了关键作用^[9]。GA20-氧化酶(GA20ox)、GA3-氧化酶(GA3ox)和GA2-氧化酶(GA2ox)是参与植物GA合成与代谢的关键酶^[10]。GA20ox和GA3ox参与GA合成,而GA2ox则参与GA的分解代谢^[11-16]。GA2ox可以使具有活性的GAs失活,降低植物体内活性GAs的量^[17],并能够抑制拟南芥*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh种子下胚轴的伸长^[18]。自1999年Thomas首次从红花菜豆*Phaseolus coccineus* L.中克隆了GA2ox基因^[12],拟南芥*Arabidopsis thaliana* L. GA2ox基因已有8个序列被克隆出来^[19-21],水稻*Oryza sativa* L.中10个序列被克隆出来^[14,22-24],杨树*Populus tremula* L.^[25]、辣椒*Capsicum annum* L. *CaGA2ox1*^[26]、高羊茅*Festuca arundinacea* Schreb. *FaGA2ox*^[27]、“藤稔”葡萄*Vitis vinifera* × *V. labrusca* Linn. *VvGA2ox1*^[28]、苹果*Malus domestica* Borkh. 茎尖组织 *GA2ox*^[29]、棉花*Gossypium hirsutum* L. *GhGA2ox2*^[10]等多个物种的植物中都有报道。

本实验室在前期的研究中通过高通量测序获得西洋参种子78 207条unigenes序列,从这些unigenes基因注释信息中挖掘出与GA合成与分解代谢相关的基因序列,共得到11条GA2ox基因相关序列,通过Blastn比对和ORF Finder确定GA2ox的unigenes序列;根据选定序列设计引物,采用RT-PCR方法扩增西洋参GA2ox的cDNA全长从中发现了与GA相关的转录本。本实验对西洋参GA2ox的cDNA序列进行克隆、表达分析及生物信息学分析,为阐明西洋参种子休眠解除和萌发过程中GA的代谢途径奠定基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

四年生西洋参种子、根、茎、叶,取自于中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所试验田。对西洋参阴干种子进行高温层积,裂口种子即完成形态休眠的种子进行低温层积,不同休眠阶段分别取样。用75%乙醇清洗3次,蒸馏水清洗3次,然后用吸水纸吸去水分,剥掉种皮,立刻冻存于液氮中,-80℃冰箱中保存备用。大肠杆菌DH5 α 感受态细胞购自天根生物公司。

1.2 试剂

植物多糖多酚核糖核酸(RNA)提取试剂盒购自北京百泰克生物公司。PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 反转录试剂盒、PrimeSTAR[®] HS (Premix) 酶、pMD19-T vector、SYBR[®] Premix Ex TaqTM (Tli RNase Plus) 试剂盒均购自日本宝生物公司。加RT124反应液、通用型DNA纯化回收试剂盒(离心柱型)购自天根生物公司。本研究所用引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司北京分部合成。其他试剂均为分析纯国产试剂。

2 方法

2.1 RNA的提取和cDNA的合成

取西洋参不同部位(根、茎、叶),不同休眠期种子样品,在液氮中研磨,按照植物多糖多酚RNA提取试剂盒操作步骤提取各样品总RNA,利用NanoDrop 2000进行定量测定,之后用1.2%的琼脂糖电泳检测其完整性。DNase I处理去除提取物中所含的DNA。按照PrimeScriptTM RT reagent Kit 试剂盒操作说明将RNA反转录成第一链互补链DNA(cDNA)。

2.2 PqGA2ox基因的克隆及序列测定

以西洋参生理休眠种子cDNA为模板,按照以下体系对PqGA2ox基因进行扩增:cDNA 2.0 μ L, PrimeSTAR[®] HS (Premix) 酶 12.5 μ L,上下游引物各1 μ L,超纯水 8.5 μ L,终体积 25 μ L。反应程序:94℃预变性3 min,之后进行30个循环,98℃、10 s,58℃、30 s,72℃、90 s,循环结束后72℃ 5 min延伸反应,4℃保温。1.2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,对扩增所得目的片段进行切胶回收。PCR反应引物为F-ATGGTAGTCTTGCCCAA-GCCAACAA, R-TCATGAGGCTGCAATTTTCTCAAAG。

将回收产物连接到pMD19-T载体,转化大肠

杆菌 (DH5 α 菌株), 在含有氨苄的 LB 平板上进行培养, 挑取阳性克隆经菌落 PCR 扩增和电泳检测后送生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

2.3 *PqGA2ox* 生物信息学分析

按相关软件 (表 1) 对 *PqGA2ox* 基因编码蛋白

进行理化性质、结构域、二级结构、分泌蛋白、定位信号、跨膜区和疏水性预测和分析, 并建立该蛋白的三维模型。利用美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 的蛋白质序列数据库, 通过 DNAMAN 氨基酸序列比对并绘制系统进化树。

表 1 生物信息学分析软件
Table 1 Bioinformatic analysis software

作用	软件	网址
理化性质	ExPASy ProtParam	http://www.expasy.ch/tools/protparam.html
蛋白质结构域	InterProScan	http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/
	NCBI conserved domains	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi
二级结构	SOPMA	http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html
分泌蛋白	Signal P4.0 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
跨膜区	TMHMM Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
定位信号	WOLF PSORT	http://wolfsort.org/
疏水性	ExPASy ProScale	http://web.expasy.org/protscale/
三维建模	SWISS-MODEL	http://swissmodel.expasy.org/
氨基酸序列比对	NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

2.4 *PqGA2ox* 基因在不同组织的特异性表达分析

为了检测 *PqGA2ox* 基因在种子休眠的各个时期和西洋参根、茎、叶中的表达情况, 以西洋参肌动蛋白 (Actin) 基因为内参基因 (Actin-F AACCAGCCAGGTGCGACA, Actin-R CGAAGGG-CCGGACTCAT), 利用 qRT-PCR 技术进行扩增。反应体系: SYBR[®]Premix Ex Taq[™] 10 μ L, 正反引物各 0.8 μ L (F-TTCACAGCACA ACTGAGGTT; R-AGAGTATTGGTCGTAACGGC), cDNA 模板 1.5 μ L, 超纯水 6.9 μ L, 终体积 20 μ L。扩增程序如下: 95 $^{\circ}$ C、30 s, 以下 40 个循环: 95 $^{\circ}$ C、10 s, 58 $^{\circ}$ C、20 s, 72 $^{\circ}$ C、20 s, 循环结束后 60 $^{\circ}$ C \rightarrow 95 $^{\circ}$ C、30 s。实验做 2 个生物学重复和 3 个技术重复, 用 Bio-RAD CFX-96 系统自带软件进行分析。

3 结果与分析

3.1 西洋参种子 *PqGA2ox* 基因的克隆

通过搜索西洋参种子高通量测序的转录组数据, 找到 11 条与 *GA2ox* 相关的 unigene, 其中 unigene12642 全长 1 322 bp 的转录本被注释为 GA2-氧化酶, 详细信息见表 2。通过 NCBI 的 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 分析, 发现该转录本具有一个完整的开放阅读框 (open readingframe, ORF), 通过 Blastp 比对发现该开放阅读框与野生烟草 *Nicotiana attenuate* L. 的 *GA2ox*

表 2 与 *GA2ox* 相关的 11 条 unigene

Table 2 Eleven unigenes related to *GA2ox*

基因	长度 /bp	注释
unigene391	231	gibberellin 2-oxidase (<i>Solanum lycopersicum</i>)
unigene503	479	gibberellin 2-oxidase 1 (<i>Nicotiana tabacum</i>)
unigene3243	524	gibberellin 2- β -dioxxygenase (<i>Ectocarpus siliculosus</i>)
unigene12642	1 322	gibberellin 2-oxidase (<i>Populus trichocarpa</i>)
unigene12643	1 222	gibberellin 2-oxidase (<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>)
unigene13157	738	gibberellin 2-oxidase 1 (<i>Nicotiana sylvestris</i>)
unigene43376	264	gibberellin 2- β -dioxxygenase 7 (<i>Zea mays</i>)
unigene43992	191	gibberellin 2- β -dioxxygenase 8 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
unigene46625	601	gibberellin 2-oxidase (<i>Vigna angularis</i>)
unigene48244	196	gibberellin 2-oxidase (<i>Triticum aestivum</i>)
unigene21378	302	gibberellin 2-oxidase (<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>)

(AFA35957.1) 氨基酸序列相似性为 78%。根据 ORF 序列设计引物 (F-ATGGTAGTCTTGCC-CAAGCCAACAA, R-TCATGAGGCTGCAATTTT-CTCAAAG), 以西洋参生理休眠期种子 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板, 利用 PCR 技术得到一条长度为 987 bp 的序列, 对所扩增基因命名为 *PqGA2ox*, 并将该核酸序列提交到 NCBI, 获得

GenBank 登录号为 KJ802836，该序列与 unigene12642 相似性 99.19%，证明前期高通量测序拼接准确（图 1）。

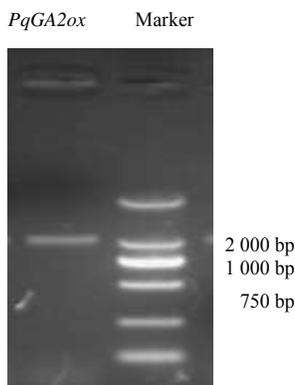


图 1 *PqGA2ox* 基因的克隆
Fig. 1 Cloning of *PqGA2ox* gene

3.2 *PqGA2ox* 基因编码蛋白特性分析

3.2.1 理化性质分析 利用 ExPASy Proteomics Server 的在线软件 ProtParam 预测 *PqGA2ox* 编码蛋白的理化性质。*PqGA2ox* 编码蛋白由 328 氨基酸编码，分子式 $C_{1658}H_{2567}N_{429}O_{492}S_{14}$ ，总原子数 5 160。相对分子质量 36 831.0，理论等电点 5.31，带正电残基（Asp+Glu）42，带负电残基（Asp+Lys）34。不稳定系数 45.04，表示 *PqGA2ox* 编码蛋白不稳定。脂肪系数 84.12，亲水系数 -0.239。

3.2.2 *PqGA2ox* 二级结构分析及结构预测 采用 SOPMA 预测 *PqGA2ox* 的二级结构，结果表明 *PqGA2ox* 编码蛋白二级结构中 α -螺旋占 32.01%、延伸链占 16.77%、 β -折叠占 4.88%、无规则卷曲占 46.34%。InterProScan 和 conserved domains 的结构域结果表明，有 2 个比较保守的结构域，分别是异青霉素 N 合成酶（isopenicillin N synthase-like, IPR027443）及其相关的双加氧酶（non-haem dioxygenase N-terminal domain, DIOX-N, IPR026992）的保守结构域和依赖于 2-酮戊二酸和 Fe^{2+} 的双加氧酶超家族（oxoglutarate/iron-dependent dioxygenase, 20G-Fell_Oxy, IPR005123）保守结构域。以上结构域分别位于 12~319、23~112 和 171~275 位氨基酸残基之间。利用 ExPASy 的 Prosite 分析 *PqGA2ox* 的功能位点，结果表明，保守功能域为 Fe^{2+} 结合域，该保守域由第 198 位和 256 位的组氨酸 His 残基，第 200 位的一个酸性氨基酸天冬氨酸 Asp 残基组成（图 2）。



图 2 ExPASy 分析 *PqGA2ox* 功能位点

Fig. 2 Functional site analysis of *PqGA2ox* with ExPASy

3.2.3 *PqGA2ox* 蛋白三维结构建模 在 SWISS-MODEL 依据保守结构域作图工具中，以拟南芥花青素合成酶（PBD NO.: 1gp4.1.A）为模板，对 *PqGA2ox* 编码蛋白进行三维结构建模（图 3）。拟南芥花青素合成酶属于 20G-Fell_Oxy 家族和 DIOX-N 家族，相似性 27.97%，因此以其为模板。

3.2.4 蛋白疏水性分析 利用 ExPASy ProtScale 程序对西洋参 *PqGA2ox* 编码的蛋白做疏水性预测，结果显示该蛋白的疏水性最大值 1.733，最小值 -2.233。从图 4 可以看出，*PqGA2ox* 编码蛋白的疏水性区域与亲水性区域交替出现，没有典型的疏水性区域。

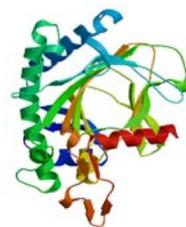


图 3 *PqGA2ox* 蛋白三维模型

Fig. 3 Three-dimensional model for *PqGA2ox* protein

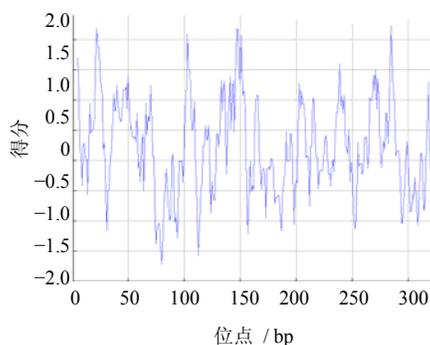


图 4 *PqGA2ox* 氨基酸序列疏水性分析

Fig. 4 Hydrophobicity analysis of *PqGA2ox* amino acid sequence

3.2.5 *PqGA2ox* 跨膜区、信号肽、亚细胞定位预测分析 利用 TMHMM 预测 *PqGA2ox* 编码蛋白的跨膜区，结果显示该蛋白不具有跨膜区（图 5），与其疏水性分析结果一致。利用 SignalP4.1Server 预测 *PqGA2ox* 蛋白不具有信号肽，预示该蛋白不可能在细胞中发生移动，与跨膜区分析相吻合。利用在线工具 WOLF PSORT 预测该蛋白的亚细胞定位情况

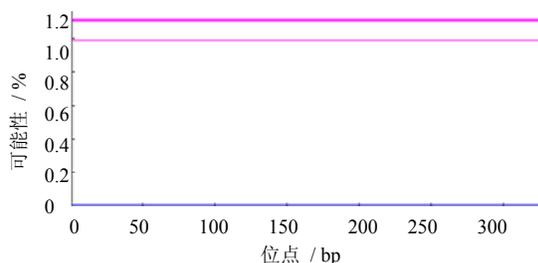


图5 预测 *PqGA2ox* 蛋白的跨膜区

Fig. 5 Predicted transmembrane domain of *PqGA2ox* protein

如下:细胞质的定位系数为 9.0,细胞核的定位系数为 4.0。因此,该蛋白最可能定位于细胞质和细胞核。

3.3 *PqGA2ox* 编码氨基酸序列相似性和功能分析

在 NCBI 上进行 Blastn 分析,发现西洋参 *PqGA2ox* 核苷酸序列与矮牵牛 *Petunia hybrid* Vilm. (GU059939.2、JQ323102.1)、茶花 *Camellia lipoens* L. (KJ502289.1、KJ502290.1) 的基因序列相似性分别是 81%、80%、81%、80%。由 *PqGA2ox* 推导的氨基酸序列进行 Blastp 分析,与野生烟草 (AFA35957.1) *GA2ox* 蛋白的氨基酸序列的序列相似性最高为 78%,与矮牵牛 (ACY01189.1) 77%,毛白杨 *Populus tomentosa* Carr. (AFP58845.1) 75%,皱叶烟草 *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. (CAR92132.1) 75%,黄瓜 *Cucumis sativus* Linn. (CCD28485.1) 74%,番茄 *Solanum lycopersicum* Mill. (ABO27633.1) 74%,笋瓜 *Cucurbita maxima* Duch. (CAC83090.1) 73%,葡萄 (AFJ05044.1) 72%,白梨 *Pyrus bretschneideri* Rehd. (AHM26650.1) 71%,苹果 (ACT99992.1) 71%,拟南芥 (AAM62763.1) 58%。

GA2ox 是 GA 代谢途径中的双加氧酶,以 2-酮戊二酸作底物,西洋参 *PqGA2ox* 蛋白含有与其他植物共有的保守结合氨基酸位点,即与 2-酮戊二酸结合的 1 个 R 残基和 1 个 S 残基,分别位于 226 位和 228 位;与 Fe^{2+} 结合的 2 个 H 残基和 1 个 D 残基 (图 6)。

3.4 *PqGA2ox* 编码蛋白的系统进化树

为了分析 *PqGA2ox* 编码蛋白的进化情况,从 NCBI 的 Nr 数据库中选取了 13 条 *GA2ox* 序列,利用 MEGA 6.06 中的 neighbor-joining (NJ) 法构建系统进化树。这些序列包括野生烟草 (AFA35957.1)、矮牵牛 (ACY01189.1)、毛白杨 (AFP58845.1)、黄瓜 (CCD28485.1)、拟南芥 (AAM62763.1)、葡萄 (AFJ05044.1)、苹果 (ACT99992.1)、欧洲夹竹桃 *Nerium oleander* L. (AAT72916.1)、日本粳稻 *Oryza sativa* L. subsp. Kato.

(BAC16752.1)、桑 *Morus notabilis* L. (EXC29353.1)、夏堇 *Torenia fournieri* Linden. (BAJ65444.1)、小麦 *Triticum aestivum* L. (AEA30113.1)、玉米 *Zea mays* L. (NP_001152057.1)。进化树如图 7 所示,*PqGA2ox* 与野生烟草、矮牵牛的亲缘关系较近,和氨基酸序列 Blastp 分析结果一致。

3.5 *PqGA2ox* 基因的组织特异性表达分析

利用实时定量 PCR 方法对 *PqGA2ox* 进行基因组组织表达分析,材料包括根、茎、叶、浸水种子即形态休眠起始期 (S1)、形态休眠期中期的种子 (S2)、解除形态休眠种子即裂口种子 (S3)、低温处理 24 h 种子即生理休眠起始期种子 (S4)、生理休眠期中期的种子 (S5)、解除休眠的胚乳 (En)、胚 (Em)。结果表明:*PqGA2ox* 在西洋参不同器官和休眠不同阶段存在差异表达,在茎中表达丰度最高,高于根和叶中;在 S1 和 S3 表达量高于 S2; S4 和 Em 表达量高于 S5;在 Em 中表达高于 En 中 (图 8)。

4 讨论

西洋参种子休眠属于 MPD 型休眠,解除休眠的过程十分漫长,需要经过 20 °C 的高温层积 6 个月左右来完成胚的发育即解除形态休眠,之后还要经过 4 °C 的低温层积来解除生理休眠。之前的研究主要集中在层积最适温度的研究^[30-31]、休眠种子的发育特点^[32]、不同激素处理对西洋参种子休眠的影响^[33-34]和西洋参各部位抑制物质^[35-37]、激素^[38]的研究,但对西洋参种子休眠内在机制的研究鲜见报道。本研究针对西洋参种子休眠的研究现状,首次克隆出西洋参种子休眠解除过程中 GA 的分解代谢关键基因 *PqGA2ox*,并获得 GenBank 登陆号 KJ802836。通过生物信息学分析了 *PqGA2ox* 基因的二级结构、三级结构等基本特性,最后通过 RT-PCR 方法检测休眠解除过程中各时期种子的相对表达量,发现 *PqGA2ox* 基因在形态休眠期中期的种子 S2 表达低于浸水 24 h 种子 S1 和解除形态休眠期的种子 S3,而且在生理休眠期呈现同样的表达规律,即在生理休眠期中期的种子 S5 低于生理休眠起始期 S4 和解除休眠的胚 Em 中的表达表达。*GA2ox* 能够导致 GAs 失活和活性 GAs 量降低,*PqGA2ox* 基因在两个休眠起始期 S1、S4 期表达量高说明 *PqGA2ox* 基因在休眠的起始期高表达,活性 GAs 的量较低,之后 *PqGA2ox* 基因表达量降低,说明活性 GAs 量上升,

AFJ05044.1	MVVLSTFTIADFFPIIN.CKSTTLFVTLTDLSEFQKPIVYSCCHGFFKRWLIDIFLELISLIDVWIFFFSLSLEKCRAGFPD	89
CAC83090.1MAASSFSAAFNSHIDLALRFRQIIVKACEHGFYVYKHGVEMLLSLSLEBSTIFFSFLLEKCRAGFPD	77
<i>PqGA2ox</i>	MVVLSTFTIADFFPIIN.CKSTTLFVTLTDLSEFQKPIVYSCCHGFFKRWLIDIFLELISLIDVWIFFFSLSLEKCRAGFPD	85
AFA35957.1MANNI.CKATSFNNGVPLDLSRFDKRMIVKACEHGFYVYKHGVEMLLSLSLEBSTIFFSFLLEKCRAGFPD	76
CAR92132.1	MVVLSTFTIADFFPIIN.CKSTTLFVTLTDLSEFQKPIVYSCCHGFFKRWLIDIFLELISLIDVWIFFFSLSLEKCRAGFPD	89
ACV01189.1MVILS.KPKDPLRFGVPLDLSRFDKRMIVKACEHGFYVYKHGVEMLLSLSLEBSTIFFSFLLEKCRAGFPD	77
ABO27633.1MVILS.KPKDPLRFGVPLDLSRFDKRMIVKACEHGFYVYKHGVEMLLSLSLEBSTIFFSFLLEKCRAGFPD	76
CCD28485.1MASAASSPFAFLSEVPLDLSRFDKRMIVKACEHGFYVYKHGVEMLLSLSLEBSTIFFSFLLEKCRAGFPD	77
AHM26650.1	MVFLVITSEHFSYFRTSTVSKLSEGIPLDITFDKQCLIVNACEHGFYVYKHGVEMLLSLSLEBSTIFFSFLLEKCRAGFPD	90
AFP58845.1	MVLVHHPALQQFSFIRN.IKPTIFFSGIPLDITFDKQCLIVNACEHGFYVYKHGVEMLLSLSLEBSTIFFSFLLEKCRAGFPD	89
AAM62763.1MAVLSKFKVAVPKSGSLIPLDITFDKQCLIVNACEHGFYVYKHGVEMLLSLSLEBSTIFFSFLLEKCRAGFPD	79
ACT99992.1	MVFLVITSEHFSYFRTSTVSKLSEGIPLDITFDKQCLIVNACEHGFYVYKHGVEMLLSLSLEBSTIFFSFLLEKCRAGFPD	90
相同基因	p d p k v ce gffk le e ffs ek p	
AFJ05044.1	GYGNSTIGRNDV.GWVEVLDLIMCERNSQLLITIFRYEKLCSLNDVYGVVWVMAEILELMLAGLHQRNVVSLLDLDCDSV	179
CAC83090.1	GYGNSTIGRNDV.GWVEVLDLIMCERNSQLLITIFRYEKLCSLNDVYGVVWVMAEILELMLAGLHQRNVVSLLDLDCDSV	167
<i>PqGA2ox</i>	GYGNSTIGRNDV.GWVEVLDLIMCERNSQLLITIFRYEKLCSLNDVYGVVWVMAEILELMLAGLHQRNVVSLLDLDCDSV	175
AFA35957.1	GYGNSTIGRNDV.GWVEVLDLIMCERNSQLLITIFRYEKLCSLNDVYGVVWVMAEILELMLAGLHQRNVVSLLDLDCDSV	166
CAR92132.1	GYGNSTIGRNDV.GWVEVLDLIMCERNSQLLITIFRYEKLCSLNDVYGVVWVMAEILELMLAGLHQRNVVSLLDLDCDSV	179
ACV01189.1	GYGNSTIGRNDV.GWVEVLDLIMCERNSQLLITIFRYEKLCSLNDVYGVVWVMAEILELMLAGLHQRNVVSLLDLDCDSV	167
ABO27633.1	GYGNSTIGRNDV.GWVEVLDLIMCERNSQLLITIFRYEKLCSLNDVYGVVWVMAEILELMLAGLHQRNVVSLLDLDCDSV	166
CCD28485.1	GYGNSTIGRNDV.GWVEVLDLIMCERNSQLLITIFRYEKLCSLNDVYGVVWVMAEILELMLAGLHQRNVVSLLDLDCDSV	167
AHM26650.1	GYGNSTIGRNDV.GWVEVLDLIMCERNSQLLITIFRYEKLCSLNDVYGVVWVMAEILELMLAGLHQRNVVSLLDLDCDSV	180
AFP58845.1	GYGNSTIGRNDV.GWVEVLDLIMCERNSQLLITIFRYEKLCSLNDVYGVVWVMAEILELMLAGLHQRNVVSLLDLDCDSV	179
AAM62763.1	GYGNSTIGRNDV.GWVEVLDLIMCERNSQLLITIFRYEKLCSLNDVYGVVWVMAEILELMLAGLHQRNVVSLLDLDCDSV	169
ACT99992.1	GYGNSTIGRNDV.GWVEVLDLIMCERNSQLLITIFRYEKLCSLNDVYGVVWVMAEILELMLAGLHQRNVVSLLDLDCDSV	180
相同基因	qyg ig ngd g e l a y v m le ql sl d ds	
AFJ05044.1	RNNHYPCPELQASGNK...MIGFEHTDQIIISVRSNN.SGQIQLRIGSW.SVPPDHSFFNVGDSLQV.TNGRF.SVHRVLL	265
CAC83090.1	RNNHYPCPELQALKGTN...MIGFEHTDQIIISVRSNN.SGQIQLRIGSW.SVPPDHSFFNVGDSLQV.TNGRF.SVHRVLL	253
<i>PqGA2ox</i>	RNNHYPCPELQALKGTN...MIGFEHTDQIIISVRSNN.SGQIQLRIGSW.SVPPDHSFFNVGDSLQV.TNGRF.SVHRVLL	259
AFA35957.1	RNNHYPCPELQALKGTN...MIGFEHTDQIIISVRSNN.SGQIQLRIGSW.SVPPDHSFFNVGDSLQV.TNGRF.SVHRVLL	252
CAR92132.1	RNNHYPCPELQALKGTN...MIGFEHTDQIIISVRSNN.SGQIQLRIGSW.SVPPDHSFFNVGDSLQV.TNGRF.SVHRVLL	265
ACV01189.1	RNNHYPCPELQALKGTN...MIGFEHTDQIIISVRSNN.SGQIQLRIGSW.SVPPDHSFFNVGDSLQV.TNGRF.SVHRVLL	252
ABO27633.1	RNNHYPCPELQALKGTN...MIGFEHTDQIIISVRSNN.SGQIQLRIGSW.SVPPDHSFFNVGDSLQV.TNGRF.SVHRVLL	254
CCD28485.1	RNNHYPCPELQALKGTN...MIGFEHTDQIIISVRSNN.SGQIQLRIGSW.SVPPDHSFFNVGDSLQV.TNGRF.SVHRVLL	253
AHM26650.1	RNNHYPCPELQALKGTN...MIGFEHTDQIIISVRSNN.SGQIQLRIGSW.SVPPDHSFFNVGDSLQV.TNGRF.SVHRVLL	269
AFP58845.1	RNNHYPCPELQALKGTN...MIGFEHTDQIIISVRSNN.SGQIQLRIGSW.SVPPDHSFFNVGDSLQV.TNGRF.SVHRVLL	265
AAM62763.1	RNNHYPCPELQALKGTN...MIGFEHTDQIIISVRSNN.SGQIQLRIGSW.SVPPDHSFFNVGDSLQV.TNGRF.SVHRVLL	257
ACT99992.1	RNNHYPCPELQALKGTN...MIGFEHTDQIIISVRSNN.SGQIQLRIGSW.SVPPDHSFFNVGDSLQV.TNGRF.SVHRVLL	269
相同基因	r nhypc igfgehtdpqiis rsnn sg qi l g w svppd sff nvgdsq v tng sv hrvl	
AFJ05044.1	RNSKFRSMIYFGPFLSEI.IAPLAS.LMEGES.LMEFTW.EYKRSAYKTRLD.RIVHF.FRTAAS...	332
CAC83090.1	RNSKFRSMIYFGPFLSEI.IAPLAS.LMEGES.LMEFTW.EYKRSAYKTRLD.RIVHF.FRTAAS...	321
<i>PqGA2ox</i>	RNSKFRSMIYFGPFLSEI.IAPLAS.LMEGES.LMEFTW.EYKRSAYKTRLD.RIVHF.FRTAAS...	328
AFA35957.1	RNSKFRSMIYFGPFLSEI.IAPLAS.LMEGES.LMEFTW.EYKRSAYKTRLD.RIVHF.FRTAAS...	319
CAR92132.1	RNSKFRSMIYFGPFLSEI.IAPLAS.LMEGES.LMEFTW.EYKRSAYKTRLD.RIVHF.FRTAAS...	332
ACV01189.1	RNSKFRSMIYFGPFLSEI.IAPLAS.LMEGES.LMEFTW.EYKRSAYKTRLD.RIVHF.FRTAAS...	320
ABO27633.1	RNSKFRSMIYFGPFLSEI.IAPLAS.LMEGES.LMEFTW.EYKRSAYKTRLD.RIVHF.FRTAAS...	322
CCD28485.1	RNSKFRSMIYFGPFLSEI.IAPLAS.LMEGES.LMEFTW.EYKRSAYKTRLD.RIVHF.FRTAAS...	321
AHM26650.1	RNSKFRSMIYFGPFLSEI.IAPLAS.LMEGES.LMEFTW.EYKRSAYKTRLD.RIVHF.FRTAAS...	337
AFP58845.1	RNSKFRSMIYFGPFLSEI.IAPLAS.LMEGES.LMEFTW.EYKRSAYKTRLD.RIVHF.FRTAAS...	332
AAM62763.1	RNSKFRSMIYFGPFLSEI.IAPLAS.LMEGES.LMEFTW.EYKRSAYKTRLD.RIVHF.FRTAAS...	328
ACT99992.1	RNSKFRSMIYFGPFLSEI.IAPLAS.LMEGES.LMEFTW.EYKRSAYKTRLD.RIVHF.FRTAAS...	337
相同基因	n k r smiyf gp l iapl y eftw eyk rl d rl fe	

#与Fe²⁺结合的氨基酸 *与2-酮戊二酸结合的氨基酸
 #Fe²⁺-binding amino acid *2-oxoglutarate-binding amino acid

图 6 *PqGA2ox* 与其他物种氨基酸序列相似性比较

Fig. 6 Similarity comparison on amino acid sequences of *PqGA2ox* with those of other species

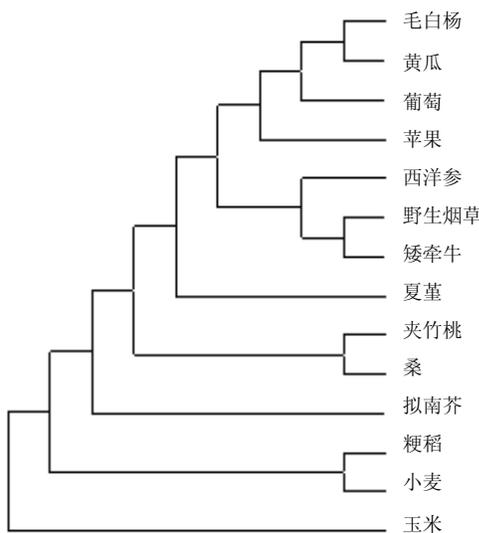
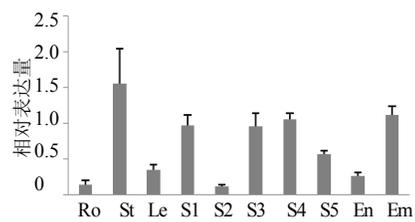


图 7 *PqGA2ox* 的进化分析

Fig. 7 Phylogenetic analysis of *PqGA2ox*



Ro-根 St-茎 Le-叶 S1-浸水种子即形态休眠起始期种子 S2-形态休眠期中期种子 S3-解除形态休眠的种子 S4-低温处理种子即生理休眠起始期种子 S5-生理休眠期中期的种子 En-解除休眠的胚乳 Em-解除休眠的胚

Ro-root St-stem Le-leaf S1-soaking seed as onset dates of morphological dormancy S2-seed in mid-term of morphological dormancy S3-seed of morphological dormancy release S4-hypothermia treatment seed as onset date of physiological dormancy S5-seed in mid-term of physiological dormancy En-endosperm of dormancy release Em-embryo of dormancy release

图 8 荧光定量检测 *PqGA2ox* 基因的表达

Fig. 8 Expression analysis of *PqGA2ox* using RT-PCR

推测 GA 在形态、生理休眠中期 S2、S5 中期解除休眠促进萌发中发挥作用显著。

本研究结果不仅为分析 *PqGA2ox* 基因的分子功能提供依据, 而且为西洋参种子休眠解除与萌发机制的研究提供基础。*PqGA2ox* 基因是 GAs 中的一员, 目前已发现 100 多种 GA 分子, 但仅有少数具有生物学活性^[39], 为进一步研究 GAs 在种子休眠与萌发中的作用, 在后续研究中需要克隆西洋参 GAs 基因家族的其他成员, 分析各成员间表达是否存在规律。

参考文献

- [1] 李学芝, 孙国刚, 孙秀安, 等. 短体西洋参栽培新技术 [J]. 人参研究, 2007(3): 32-33.
- [2] Bewley J D. Seed germination and dormancy [J]. *Plant Cell*, 1997, 9(7): 1055-1066.
- [3] Finch-Savage W E, Cadman C S, Toorop P E, et al. Seed dormancy release in *Arabidopsis* Cvi by dry after-ripening, low temperature, nitrate and light shows common quantitative patterns of gene expression directed by environmentally specific sensing [J]. *Plant J*, 2007, 516(1): 60-78.
- [4] Baskin J M, Baskin C C. A classification system for seed dormancy [J]. *Seed Sci Res*, 2004, 14(1): 1-16.
- [5] Baskin C C. Breaking physical dormancy in seeds-focussing on the lens [J]. *New Phytol*, 2003, 158(2): 227-238.
- [6] Maarten K, Leónie B, Henk H. Seed dormancy and germination [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5(1): 33-36.
- [7] Mitsunori S, Yusuke J, Kamiya Y J. Profiling of hormones and related metabolites in seed dormancy and germination studies [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 773(8): 99-111.
- [8] Birgit K, Marc A, Gerhard L M. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination [J]. *Seed Sci Res*, 2005, 15(4): 281-307.
- [9] Kucerna B, Cohn M A, Leubner M G. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination [J]. *Seed Sci Res*, 2005, 15(4): 281-307.
- [10] Cetinbas M, Koyuncu F. Improving germination of *Prunus avium* L. seeds by gibberellic acid, potassium nitrate and thiourea [J]. *Horticulture Sci*, 2006, 33(3): 119-123.
- [11] 胡林. 棉花赤霉素代谢基因 *GhGA2ox2* 的功能分析 [D]. 重庆, 西南大学, 2010.
- [12] Stephen G T, Andrew L P, Peter H. Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, 96(8): 4698-4703.
- [13] Hedden P, Phillips A L, Rojas M C, et al. Gibberellin biosynthesis in plants and fungi: A case of convergent evolution? [J]. *J Plant Growth Regul*, 2001, 20(4): 319-331.
- [14] Lester D R, Ross J J, Smith J J, et al. Gibberellin 2-oxidation and the SLN gene of *Pisum sativum* [J]. *Plant J*, 1999, 19(1): 65-73.
- [15] Sakamoto T, Kobayashi M, Itoh H, et al. Expression of a gibberellin 2-oxidase gene around the shoot apex is related to phase transition in rice [J]. *Plant Physiol*, 2001, 125(3): 1508-1516.
- [16] Yamaguchi S, Annu R. Gibberellin metabolism and its regulation [J]. *Plant Biol*, 2008, 59: 225-251.
- [17] Chen Q F, Ya H Y, Li S M, et al. Isolation and analysis of homoeologous genes encoding gibberellins 2-oxidase 3 isozymes in common wheat [J]. *J Genet*, 2012, 91(3): 1-9.
- [18] Schomburg F M, Bizzell C M, Lee D J, et al. Overexpression of a novel class of gibberellin 2-oxidase decreases gibberellins levels and creates dwarf plants [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(1): 151-163.
- [19] Zhao X Y, Yu X H, Foo E, et al. A study of gibberellin homeostasis and cryptochrome mediated blue light inhibition of hypocotyls elongation [J]. *Plant Physiol*, 2007, 145(1): 106-118.
- [20] Yamauchi Y, Takeda K N, Hanada A, et al. Contribution of gibberellin deactivation by AtGA2ox2 to the suppression of germination of dark-imbibed *Arabidopsis thaliana* seeds [J]. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48(3): 555-561.
- [21] Athanasios T, Joseph R E, Curtis J P, et al. Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nature*, 2000, 408(6814): 816-820.
- [22] Mayer K, Schüller C, Wambutt R, et al. Sequence and analysis of chromosome 4 of the plant *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nature*, 1999, 402(6763): 769-777.
- [23] Lo S F, Yang S Y, Chen K T, Hsing Y L, et al. A novel class of gibberellin 2-oxidases control semidwarfism, tillering, and root development in rice [J]. *Plant Cell*, 2008, 20: 2603-2618.
- [24] Hironori I, Miyako U T, Naoki S, et al. Cloning and functional analysis of two gibberellin 3 β -hydroxylase genes that are differently expressed during the growth of rice [J]. *PNAS*, 2001, 98(15): 8909-8914.
- [25] Sakamoto T, Miura K, Itoh H. An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice

- [J]. *Plant Physiol*, 2004, 134(4): 1642-1653.
- [26] Victor B B, Richard M, David W P, *et al.* Activation tagging of a dominant gibberellin catabolism gene (GA2-oxidase) from poplar that regulates tree stature [J]. *Plant Physiol*, 2003, 132(3): 1283-1291.
- [27] Lee Y, Kim Y C, Soo Y K. A novel gibberellin 2-oxidase gene *CaGA2ox1* in pepper is specifically induced by incompatible plant pathogen [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2012, 6(4): 381-390.
- [28] 徐光远, 刘松虎, 梁本国, 等. 高羊茅赤霉素 2-氧化酶编码基因的克隆及功能验证 [J]. 草地学报, 2012, 20(1): 130-138.
- [29] 王西成, 王 晨, 房经贵, 等. 葡萄 *VvGA2ox1* 基因克隆、亚细胞定位及时空表达分析 [J]. 南京农业大学学报, 2013, 36(1): 29-34.
- [30] 白牡丹, 王彩虹, 田义轲, 等. 苹果茎尖组织中 *GA2ox* 基因的结构特征及蛋白序列的生物信息学分析 [J]. 华北农学报, 2012, 27(5): 55-59.
- [31] 黄耀阁, 刘人崧, 崔树玉, 等. 人参和西洋参种子物理催芽技术研究进展 [J]. 吉林农业大学学报, 1996, 18(4): 106-113.
- [32] Thomas S C, Li K E, Bedford P L. Stratification of American ginseng seeds—problems and solutions [J]. *NPJ Fall*, 2002, 3(2): 109-111.
- [33] 车长吉, 张淑贤, 关 昕. 西洋参种胚形态后熟发育的观察 [J]. 人参研究, 1990(1): 8-9.
- [34] 赵永华, 刘惠卿, 刘铁城, 等. 外源赤霉素对西洋参种子内源激素变化动态的影响 [J]. 中药材, 2000, 23(10): 591-592.
- [35] Stoltz L P, Synder J C. Embryo growth and germination of American ginseng in response to stratification temperature [J]. *Horticultural Sci*, 1985, 20(2): 261-262.
- [36] 黄耀阁, 崔树玉, 鲁 歧, 等. 西洋参种子抑制物质的初步研究 [J]. 吉林农业大学学报, 1994, 16(2): 9-14.
- [37] 代小蕾. 西洋参种子发育的形态及生理生化研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [38] 赵永华, 杨世林, 刘慧卿, 等. 西洋参种胚形态后熟过程中种子内源激素变化动态及其对种胚发育的调节 [J]. 中草药, 2001, 32(2): 159-162.
- [39] Gao X H, Xiao S L, Yao Q F, *et al.* An updated GA signaling 'relief of repression' regulatory model [J]. *Mol Plant*, 2011, 4(4): 601-606.