

• 药材与资源 •

滇重楼种子层积后脱落酸和赤霉素相关基因表达水平的研究

徐文娟, 李先恩, 孙 鹏, 周丽莉, 孙同玉, 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 研究脱落酸(ABA)和赤霉素(GA)相关的6个基因(NCED、CYP707A、ABI2、PP2C、GA20ox2、GA20ox3)在滇重楼种子休眠解除过程中的表达特点。方法 分别选取20℃层积和20℃转4℃层积处理后处于不同休眠解除阶段的滇重楼种子为材料,应用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)方法分析不同层积处理后6个基因在胚和胚乳中的表达水平。结果 在滇重楼种子层积过程中CYP707A、NCED、GA20ox2、GA20ox3和ABI2基因在胚和胚乳中表达有差异,而PP2C表达水平无明显变化规律;CYP707A在低温层积后表达水平显著高于高温层积,尤其是在胚中,而NCED、GA20ox2、GA20ox3和ABI2在高温和低温层积后均有较高的表达水平,且在胚中的表达水平高于胚乳中。结论 所筛选出的NCED、CYP707A、ABI2、GA20ox2、GA20ox3基因参与滇重楼种子休眠解除过程,可以作为研究滇重楼种子休眠过程的重要基因。

关键词: 滇重楼; 种子休眠; 脱落酸; 赤霉素; 实时荧光定量PCR; 基因表达

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)03-0338-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.03.021

Studies on expression level of genes related to abscisic acid and gibberellic acid in stratified *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* seeds

XU Wen-juan, LI Xian-en, SUN Peng, ZHOU Li-li, SUN Tong-yu, QI Jian-jun

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

Abstract: Objective To clarify the expression profile of six related genes (NCED, CYP707A, ABI2, PP2C, GA20ox2, and GA20ox3) related to abscisic acid (ABA) and gibberellic acid (GA) during the dormancy of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* seeds.

Methods Using qRT-PCR method to clarify the six gene expression levels in seed embryo and endosperm, which were sampled in different dormancy breaking stages after performing warm (20℃) and 20℃ turned to cold (4℃) seed stratification. **Results** The CYP707A, NCED, GA20ox2, GA20ox3, and ABI2 genes had different expression profiles in embryo and endosperm while PP2C showed no significant difference. The expression level of CYP707A was higher at cold stratification than that at warm stratification especially in embryo, but the expression levels of NCED, GA20ox2, GA20ox3, and ABI2 were higher than those at two temperature stratifications, and with higher expression in embryo than that in endosperm. **Conclusion** The selected ABA and GA related genes (CYP707A, NCED, GA20ox2, GA20ox3, and ABI2) might participate in the seed dormancy breaking and could consider as an important gene for the future research.

Key words: *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Fr.) Hand. -Mazz.; seed dormancy; abscisic acid; gibberellic acid; qRT-PCR; gene expression

滇重楼 *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Fr.) Hand. -Mazz. 为延龄草科(Trilliaceae)重楼属 *Paris* L. 植物, 是重要的名贵稀缺药用植物。滇重楼种子为生理形态休眠类型种子, 即种子脱离母体植株后没有完整的胚且存在萌发抑制物, 即使外部条件最适种子也不能萌发^[1]。自然条件下, 滇重楼种子从采

集当年到第2年冬季之前完成形态后熟, 发育完全的胚芽需经过第2年冬季低温打破胚轴的休眠到第3年春季才出苗, 这说明, 温度是影响滇重楼种子萌发的重要因素。种子萌发主要受基因的表达调控, 大量突变体植株及同位素示踪技术的应用发现, 脱落酸(abscisic acid, ABA)和赤霉素(gibberellic acid,

收稿日期: 2012-10-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31171632)

作者简介: 徐文娟(1987—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为药用植物生物技术。E-mail: xwjxuwenjuan@163.com

*通信作者 祁建军 Tel: (010)62810019 E-mail: jjqi@implad.ac.cn

网络出版时间: 2013-01-08 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130108.0939.003.html>

GA)是种子休眠或解除过程中起关键作用的内源信号分子^[2],研究发现,GA能诱导种子萌发,而ABA则抑制种子萌发^[3]。NCED(9-*cis*-epoxycarotendid dioxygenase)是催化有生物活性ABA合成的关键酶^[4],CYP707A(8'-hydroxylase)是ABA分解代谢的关键基因^[5-6],GA20-oxidases是GA生物合成限速酶^[7-9],PP2C(Serine/Threonine Protein Phosphatase Type-2C)是真核生物体内一类丝氨酸/苏氨酸残基蛋白磷酸酶,ABI2(ABA Insensitive 2)是PP2C家族成员,它们参与了ABA信号转导途径的负调控功能^[10]。结合具体的实验条件和样品类型来选择合适的内参基因,采用实时荧光定量PCR(real-time quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR)分析这些基因在不同温度处理的种子中的转录水平,是研究层积温度如何影响滇重楼种子萌发的分子机制的重要部分。

本研究采用不同温度(20℃、20℃转4℃)处理滇重楼种子,初步探索在滇重楼种子中表达

稳定的参考基因,并检测不同温度层积处理对滇重楼种子种胚和胚乳NCED、CYP707A、GA20ox2、GA20ox3、ABI2、PP2C的转录水平,旨在揭示不同温度影响滇重楼种子萌发的分子机制,为探索滇重楼种子休眠破除的分子生物学方法提供理论依据。

1 材料

滇重楼种子采自云南文山,由中国医学科学院药用植物研究所祁建军副研究员鉴定为滇重楼 *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Fr.) Hand. -Mazz. 的种子;总RNA提取采用百泰克公司多糖多酚植物总RNA快速提取试剂盒;反转录酶 RimeScript[®] RT reagent Kit With gDNA Eraser (Prfect Real Time)和荧光定量试剂盒购自Takara公司;荧光定量仪器为伯乐(Bio-Rad)公司CFX—96实时荧光定量PCR仪;本研究所选目标基因来源于滇重楼胚转录组454测序获得,基本信息见表1,全部引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

表1 ABA和GA相关的基因
Table 1 Genes related to ABA and GA

基因	基因编码	基因注释	登录号
CYP707A	Contig 123	ABA 8-羟化酶	ABA55732.1
NCED	GLRWUMC02HBZ42	9- <i>cis</i> -epoxycarotendid dioxygenase	XP 002511629
ABI2	GLRWUMC02IPFK8	ABA Insensitive 2	NP 200515.1
GA20ox2	Contig6246	Gibberlin 20-氧化酶 2	NP001149543.1
GA20ox3	GLRWUMC02IWIPH	Gibberlin 20-氧化酶 3	ACJ76438.1
PP2C	Contig1287	protein phosphatase type-2C	XP 002520256.1

2 方法

2.1 滇重楼种子的层积处理

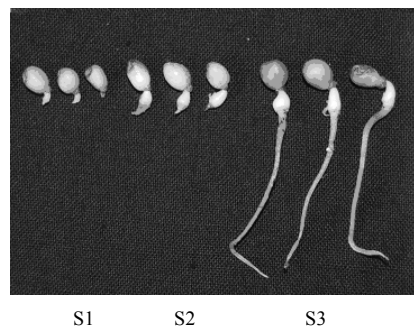
成熟种子去皮,阴干,浸泡12h,于18~20℃沙藏层积至第70天时,分为2份,一份转入4℃层积,其余仍在18~20℃条件下层积,第130天时根据胚根长度各取不同萌发阶段的种子,见图1。冲洗干净后,蒸馏水冲洗,75%乙醇冲洗,擦干,纵切种子,分离胚与胚乳,锡箔纸包裹,置液氮中冷藏备用。

2.2 序列引物设计

所有候选内参基因和目的基因序列由本实验室通过滇重楼胚转录组测序获得,通过Primer 5.0软件设计引物,见表2。

2.3 总RNA提取与质量检测

总RNA提取按照Biotek公司多糖多酚植物总RNA快速提取试剂盒步骤进行,Nanodrop核酸分析仪检测总RNA的浓度和纯度,根据选择条件



S1-胚根突破种皮 S2-胚根突破种皮后胚膨大 S3-根形成,下同
S1-stage of radicals breaking through seed coat S2-stage of embryo enlarged after radicals breaking through seed coat S3-stage of root formed, same as below

图1 滇重楼种子高温层积后不同发育阶段
Fig. 1 Different developmental stages of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* seeds stratified in high temperature

表 2 引物序列信息
Table 2 Primer sequences

基因名称		引物序列 (5'-3')		长度 / bp	
ACT-2	正向	CTCTCTCAGCACCTTCCAGCAG	反向	TAACAACCCAAACAACAATCC	160
ACT-7	正向	CTCGTCGGTGGAGAAGAGCT	反向	TCCAGGGAACGATGGTTGAT	227
HSPL	正向	TTACGGTTCGTCGAGGGAACATC	反向	GCCTCAGGCGTCTCCTTCCAGT	152
HSP90-1	正向	GTAGTCCTTGAGGCTCGTCATC	反向	AAGTGCATCGACTCTTCTTTGA	188
CAPDH-1	正向	GCCTTCCGAGTTCCAACAGCAA	反向	CACTCAAACCCCATACCAGCCT	218
CAPDH-3	正向	TTGTAGGTCGGTTAATCGTGG	反向	TTTGATTTGGCACAGGGTCT	216
CYP707A	正向	GGGGAAACTCTCAGCTCTACTCCA	反向	TCCGGGCTCGACACCATCACA	126
NCED	正向	CGCGATATGCAATGGATGACC	反向	AGGCGACAAGTGA TAGAACAAC	122
ABI2	正向	ACCCAAACTGCTCCTTTCC	反向	ATGACCAATCAAGAGGTGTGT	235
GA20ox2	正向	TAACCACTACCCACCATGCCCTTCC	反向	TCTCCGAGTTCACCGCCACCCT	251
GA20ox3	正向	TACTACCCTCCGTGCCAGAAGC	反向	CTGAAGGCCGCCAACATCGTC	105
PP2C	正向	AATGGTAACAGAGCGGCA	反向	TGTGTCCCAAATAGCAAGC	268

($A_{260/280} \approx 2.0 \sim 2.1$, $A_{260/230} \approx 2.0$) 选择合格的总 RNA, 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。

2.4 cDNA 第 1 链合成

按照 RimeScript[®] RT reagent Kit With gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒 (TAKARA) 步骤进行, 0.2 mL Eppendorf 管中配制 20 μ L 的反应体系: 总 RNA 1.0 μ g, 5 \times PrimeScript[®] 缓冲液 2 (for Real Time) 4 μ L, Primescript[®] RT Enzyme Mix 1 μ L, RT Primer Mix 1 μ L, 加 RNase Free dH₂O 补足至 20 μ L, 反应条件: 37 $^{\circ}$ C, 15 min; 85 $^{\circ}$ C, 5 s, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.5 qRT-PCR

反应在 CFX—96 型荧光定量 PCR 仪上 (Bio-Rad) 运行, 按照 SYBR premix Ex Taq[™] II 试剂盒说明步骤冰上配制反应体系: SYBR Premix EX Taq[™] (2 \times) 12.5 μ L, PCR 正向引物 (10 μ mol/L) 0.5 μ L, PCR 反向引物 (10 μ mol/L) 0.5 μ L, DNA 模板 2 μ L, 灭菌蒸馏水补足至 25 μ L, 设置温度梯度对基因进行 PCR, 最终确定反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火延伸 40 s, 40 个循环, 延伸阶段收集信号, 从 60 $^{\circ}$ C 到 95 $^{\circ}$ C, 每个循环增加 0.5 $^{\circ}$ C, 持续 0.05 s 获得解链温度, 采集融解曲线荧光信号。

3 结果与分析

3.1 总 RNA 质量检测及 cDNA 第 1 链合成

取总 RNA 样品 1 μ L 在 Nanodrop 核酸分析仪上对总 RNA 的浓度和纯度检测, 记录结果, 挑选 $A_{260/280} \approx 2.0 \sim 2.1$, $A_{260/230} \approx 2.0$ 的样品, 取 3 μ L 于

1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果显示所有样品均有完整的 5 S、18 S、28 S 条带, 且 28 S 和 18 S 的条带亮度之比约为 2, 见图 2。电泳和定量分析结果说明样品没有发生降解, 质量良好, 能满足后续实验操作的要求。样品 cDNA 第 1 链合成后均能扩增出参照基因, 证明反转录成功。

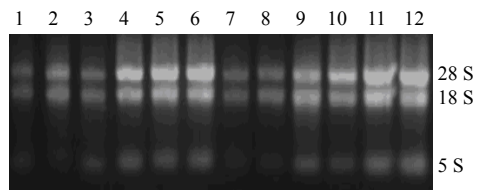


图 2 滇重楼种胚与胚乳总 RNA 电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of total RNA from embryo and endosperm of *P. pilyphylla* var. *yunnanensis* seeds

3.2 内参基因筛选

总 RNA 反转录后 4 倍浓度稀释 cDNA, 即 1、1/4、1/16、1/64、1/256, 对 6 个候选内参基因做扩增效率曲线, 通过对候选内参基因的扩增, 6 个候选内参基因扩增效率均不同。其中 90%~110% 为参考基因的最适扩增效率, 见表 3。

表3 内参基因扩增效率

基因	扩增效率 / %	r	斜率
ACT-2	107.5	0.995	3.154
GAPDH-3	109.5	0.996	3.113
HSPL	89.5	0.999	3.601
HSP90-1	94.9	0.998	3.451
ACT-7	100.4	0.996	3.312
CAPDH-1	99.7	0.970	3.328

不同层积后不同萌发阶段的滇重楼胚和胚乳共12份 cDNA, 各取相同的量分别扩增5个扩增效率合适的候选内参基因, 得出的 Ct 值在 genorm 软件中进行分析, M 值越小, 表明此基因在不同温度处

理后的滇重楼胚和胚乳中表达越稳定, 选取表达稳定的参照基因, GAPDH-3 是本实验验证的合适的参照基因。

3.3 ABA 和 GA 相关基因的转录水平分析

以 GAPDH-3 为参考基因, 以 20 °C 处理的滇重楼种子萌发初期胚为对照, 采用定量 PCR 仪内置的 BioRad CFX Manager 软件进行数据的处理分析, 每个样品做 2 次生物学重复和 3 次技术重复, 基因表达分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算方法, 分别检测 NCED、CYP707A、GA20ox2、GA20ox3、ABI2、PP2C 在不同温度层积处理后不同萌发阶段滇重楼胚和胚乳中的表达差异, 结果见图 3。

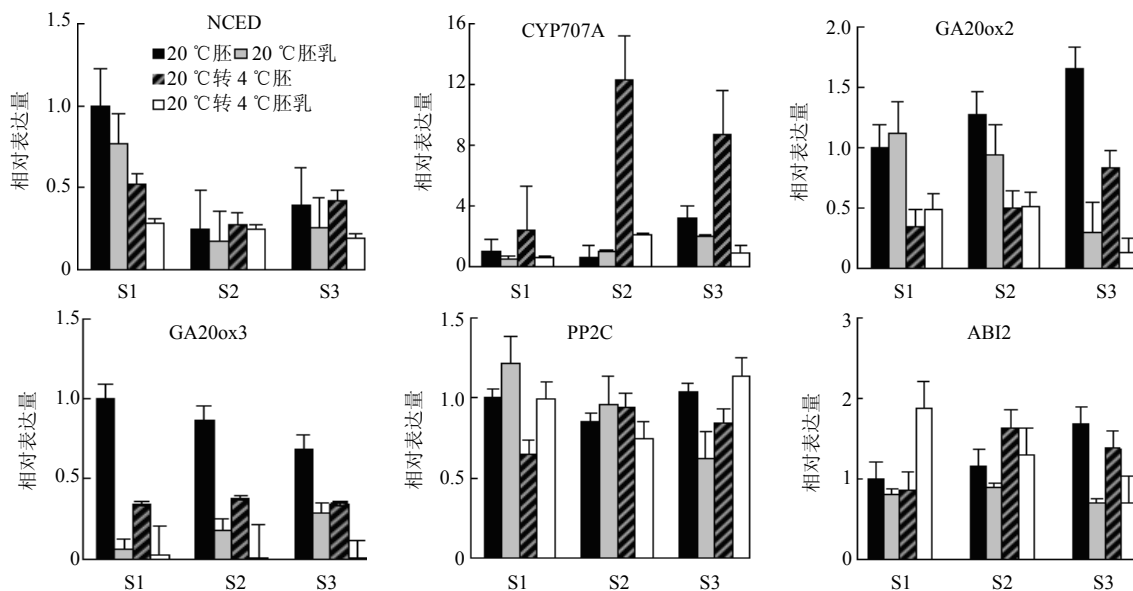


图3 NCED、CYP707A、GA20ox2、GA20ox3、PP2C、ABI2 转录水平

Fig. 3 Transcription levels of NCED, CYP707A, GA20ox2, GA20ox3, PP2C, and ABI2

由图 3 可知在不同层积温度和不同发育阶段, NCED 在胚中的表达水平显著高于胚乳中, 同时可以看出种子层积 S1 阶段, NCED 表达水平最高, 而种子萌发后 (S2、S3), NCED 表达降低。CYP707A 表达水平在低温 (4 °C) 层积时均显著增加, 且在胚中的表达显著高于胚乳中。这说明, 低温层积有利于胚中 ABA 的降解。而 ABA 合成关键酶基因 NCED 在 S2、S3 期的表达量显著低于 S1 期, 说明 ABA 的合成在层积后降低。

PP2C (包括 ABI2) 是 ABA 信号分子, 参与种子萌发的负调控。基因表达分析证明, 滇重楼种子在休眠解除初期 (S1), PP2C 和 ABI2 在胚乳中表达量较高, 而随着休眠解除和胚根生长 (S2、S3 期),

ABI2 在胚中表达显著强于胚乳中表达。

在不同温度层积中, 种子在发育的不同阶段 (S1、S2、S3), GA20ox2 在胚和胚乳中表达水平呈现相反的阶段依赖, 在胚中表达水平高低表现为 $S1 < S2 < S3$, 而在胚乳中表现为 $S1 > S2 > S3$ 。同时可以看到, GA20ox2 表达水平由 S1 期胚中低于胚乳, 至 S3 期时胚中的表达水平已经明显高于胚乳中。GA20ox3 在胚中的表达水平为 S1 最高, S2 次之, S3 最低, 而在高温 (20 °C) 层积的胚乳中的表达刚好相反, 低温 (4 °C) 层积几乎抑制其表达。GA20ox2 和 GA20ox3 是 GA 合成关键酶, 其在高温层积时在胚中均有较高的表达量, 但在胚乳中表达差异较大, 说明这两种 GA 合成关键酶对滇

重楼种子打破形态休眠有比较重要的作用。

4 讨论

ABA 和 GA 是影响种子休眠与萌发的主要因素。ABA 与种子休眠相关,在成熟种子中 ABA 突变体与种子休眠缺失相关,且当与 ABA 合成相关的基因表达上调时能提高种子中 ABA 量,从而加剧种子休眠深度,延缓种子萌发^[11-16]。突变体技术证明, CYP707A 的缺失导致了种子中大量合成 ABA。Okamoto 等^[17]采用 RNA 原位杂交技术证实了 CYP707A 在种子后熟过程中在胚和胚乳中均有表达,并验证了 CYP707A 是影响种子从休眠转向萌发的重要基因。CYP707A 在滇重楼种胚和胚乳中均有表达,这与 Okamoto 等的研究结果相符。陈翠等^[18]比较了变温和恒温对滇重楼种子出苗率的影响,结果为 18 °C 层积后再进行 0~10 °C 低温处理显著提高了出苗率,本实验中 NCED 在种胚中的表达水平高于胚乳中,低温层积对滇重楼种子中 NCED 表达无显著影响,但诱导了 CYP707A 在胚中表达水平的大幅上调,进而促进胚中 ABA 的分解代谢,这进一步证实了低温是提高滇重楼出苗率的重要因素,而主要原因是 CYP707A 大量分解代谢 ABA,而且在此过程中,胚是关键部位。Kuhn 等^[19]的种子发芽试验证明了 AtPP2CA 基因过量表达导致拟南芥的种子发芽以及气孔关闭对 ABA 不敏感,相反,该基因的缺失则表现出对 ABA 的超敏感特性,表明 PP2C 对 ABA 信号转导途径具有负调控功能。而本实验中滇重楼种胚和胚乳 PP2C 不受种子发育阶段、温度处理的影响,说明 PP2C 不是滇重楼种子发育的主要影响因子。突变体的研究证明了 ABI2 基因表达产物对 ABA 介导的信号转导途径具有负调节^[20,21],滇重楼种子在胚膨大阶段和根形成阶段均为 ABI2 在胚中表达高于胚乳中,表明 ABI2 对 ABA 信号传导的负调控作用主要发生在胚中。

研究证明, GA2ox、GA3ox、GA20ox 在 GA 参与的种子萌发中具有重要作用^[22]。GA3ox 和 GA20ox 参与 GA 的生物合成,而 GA2ox 则参与 GA 分解。本研究根据测序得到的引物未能成功扩增 GA3ox 和 GA2ox 基因,但分析了两种 GA20ox 基因。孟凡蕴等^[23]研究了滇重楼种子发育过程中内源激素的变化得出 GA₃ 量与胚的变化正相关。本项研究中, GA20ox2 呈现发育阶段依赖,随着胚根的伸长,胚中转录水平升高,这与上述研究结果相符,

而 GA20ox3 表达呈下降趋势,与上述结果相反,这证实了 GA20ox2 是影响种子发育的重要基因,其表达上调促进胚的生长。Pipinis 等^[24]比较了鹅耳枥属植物种子在恒温和变温处理下种子萌发情况的差异,得出低温处理前进行常温处理有利于种子萌发,而本研究中低温处理降低了 GA20ox2 和 GA20ox3 催化合成 GA,这与上述结论相悖。本研究比较了胚和胚乳中 GA20ox2 和 GA20ox3 的转录水平,且胚乳中转录水平表现一定的阶段依赖,这说明胚乳中 GA20ox2 的变化是影响种子发育的因素,需做深入研究。

本实验筛选了滇重楼胚和胚乳中表达稳定的参考基因,并应用其对 ABA 的合成相关基因 NCED, ABA 失活代谢相关基因 CYP707A, GA 合成相关基因 GA20ox2、GA20ox3, 转录因子 ABI2 和 PP2C 的转录水平做了分析,分析了温度对这些基因的表达影响,首次比较这些基因在胚和胚乳中转录水平,以期探索除胚外胚乳对种子发育的影响机制,然而种子萌发是一个复杂的过程,全面探索休眠相关基因需进一步研究。

参考文献

- [1] Baskin C, Baskin J M. *Determining Dormancy-breaking and Germination Requirements from the Fewest Seeds* [M]. Washington: Island Press, 2004.
- [2] Brady S M, McCourt P. Hormone cross-talk in seed dormancy [J]. *J Plant Growth Regul*, 2003, 22: 25-31.
- [3] Koornnddf J E, Bentsink L, Hilhorst H. Seed dormancy and germination [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5(1): 33-36.
- [4] Chernys J T, Zeevaart J A D. Characterization of the 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado [J]. *Plant Physiol*, 2002, 124: 343-353.
- [5] Saito S, Hirai N, Matsumoto C, et al. Arabidopsis CYP707As encode (+) abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid [J]. *Plant Physiol*, 2004, 134: 1439-1449.
- [6] Luis D B, Donna K, Linda H, et al. Effects of post harvest storage and dormancy status on ABA content, metabolism, and expression of genes involved in ABA biosynthesis and metabolism in potato tuber tissues [J]. *Plant Biol*, 2006, 61(45): 687-697.
- [7] Helliwell C A, Chandler P M, Poole A, et al. The CYP88A cytochrome P450, *ent*-kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellin biosynthesis

- pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 2065-2070.
- [8] Lange T. Cloning gibberellin dioxygenase genes from pumpkin endosperm by heterologous expression of enzyme activities in *Escherichia coli* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 6553-6558.
- [9] MacMillan J. Biosynthesis of the gibberellin plant hormones [J]. *Nat Prod Rep*, 1997, 14: 221-243.
- [10] Meyer K, Leube M P, Grill E. A protein phosphatase 2C involved in ABA transduction in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Science*, 1994, 264: 1452-1455.
- [11] Huggett J, Dheda K, Bustin S, *et al.* Real time RT-PCR normalisation; strategies and considerations [J]. *Genes Immun*, 2005, 6: 279-284.
- [12] Bustin S A. Quantification of mRNA using real time reverse transcription PCR RT-PCR: trends and problems [J]. *Mol Endocrinol*, 2002, 29: 23-29.
- [13] Finkelstein R, Gampala S S L, Rock C D. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings [J]. *Plant Cell*, 2002, 14: S15-S45.
- [14] Nambara E, Marion-Poll A. ABA action and interactions in seeds [J]. *Trends Plant Sci*, 2003, 8: 213-217.
- [15] Kushiro T, Okamoto M, Nakabayashi K, *et al.* The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism [J]. *EMBO J*, 2004, 23: 1647-1656.
- [16] Allison R, Kermode. Role of abscisic acid in seed dormancy [J]. *Plant Growth Regul*, 2005, 24: 319-344.
- [17] Okamoto M, Kuwahara A, Seo M, *et al.* CYP707A1 and CYP707A2, which encode abscisic acid 8-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2006, 141: 97-107.
- [18] 陈 翠, 杨丽云, 吕丽芬, 等. 云南重楼种子育苗技术研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(19): 1979-1983.
- [19] Kuhn J M, Boisson-Dernier A, Dizon M B, *et al.* The protein phosphatase AtPP2C anegatively regulates abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis* and effects of *abh1* on AtPP2CA mRNA [J]. *Plant Physiol*, 2006, 140: 127-139.
- [20] Ruth R, Finkelstein, Chris R. Three classes of abscisic acid (ABA)-insensitive mutations of *Arabidopsis* define genes that control overlapping subsets of ABA responses [J]. *Plant Physiol*, 1990, 94: 1172-1179.
- [21] Leung J, Merlot S, Giraudat J. The *Arabidopsis* abscisic acid-insensitive2 (ABI2) and ABI genes encode homologous protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction [J]. *Plant Cell*, 1997, 9: 759-771.
- [22] Kuera B, Cohn M A, Leubner-Metger G. Plant hormone interaction during seed dormancy release and germination [J]. *Seed Sci Res*, 2005, 15: 281-307.
- [23] 孟繁蕴, 汪丽娅, 张文生, 等. 滇重楼种胚休眠和发育过程中内源激素变化的研究 [J]. 中医药学报, 2006, 34(4): 36-38.
- [24] Pipinis E, Milios E, Kiamos. Effects of stratification and pre-treatment with gibberellic acid on seed germination of two *Carpinus* species seed [J]. *Sci Technol*, 2012, 40: 21-31.