

铁皮石斛赤霉素 3-氧化酶基因的克隆及表达分析

刘思思, 张 岗, 陈晓梅, 李淑超, 陈 娟*, 郭顺星*

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 克隆珍稀濒危药用植物铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 赤霉素 3-氧化酶 (gibberellin 3-oxidases, GA3ox) 基因 (DoGA3ox), 并进行生物信息学和表达分析。方法 采用 RACE 和 RT-PCR 技术获得 DoGA3ox 基因 cDNA 全长; 利用生物信息学软件预测其编码蛋白的理化性质、结构域及亚细胞定位等分子特性; 用 DNASTAR 7.0 和 MEGA 6.0 软件分别对其进行氨基酸多序列比对和进化关系分析; 借助实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测基因表达模式。结果 克隆到 DoGA3ox 基因 (GenBank 注册号 KT597694), cDNA 全长 1 318 bp, 编码一条由 353 个氨基酸组成的多肽, 相对分子质量为 39 052.5, 等电点 6.21; DoGA3ox 蛋白不含跨膜域和信号肽, 具有 GA3ox 的保守结构域 DIOX_N (40~130) 和 2OG-FeII_Oxy (197~299); DoGA3ox 与大葱、油棕、海枣、野茶树及蓝猪耳 GA3ox 蛋白一致性分别为 55%、56%、54%、51%、50%, 与单子叶植物大葱、油棕和海枣的亲缘关系较近。qRT-PCR 实验结果显示 DoGA3ox 基因在铁皮石斛种子共生 (非共生) 萌发 1~3 级时, 其相对表达量呈现出先升高后降低再升高的趋势, 分别为未萌发种子的 13.44 (5.21)、7.28 (2.32) 和 9.40 (6.21) 倍, 由此可知, 该基因在共生萌发种子中的表达量高于非共生萌发种子。结论 首次克隆得到 1 个 DoGA3ox 基因的全长 cDNA, 其转录本在共生和非共生不同萌发级别种子中的表达特性说明该基因在铁皮石斛种子萌发中起着重要调控作用。

关键词: 铁皮石斛; 种子萌发; 赤霉素 3-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(2016)06-0990-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.06.022

Cloning and expression analysis of gibberellin 3-oxidase gene in *Dendrobium officinale*

LIU Si-si, ZHANG Gang, CHEN Xiao-mei, LI Shu-chao, CHEN Juan, GUO Shun-xing

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

Abstract: Objective To clone the gibberellin 3-oxidase gene DoGA3ox from an important and endangered medicinal plant *Dendrobium officinale* (Orchidaceae), followed by bioinformatic and expression analysis. **Methods** RACE and RT-PCR were used to isolate the full-length gene. The physicochemical properties, conserved domains, and subcellular localization of DoGA3ox protein were determined using a series of bioinformatic tools. The phylogenetic analyses were performed using DNASTAR 7.0 and MEGA 6.0 software. Real time quantitative PCR was employed for gene expression analysis. **Results** The full-length cDNA of DoGA3ox (GenBank registration number KT597694) was 1 318 bp in size, and encoded a 353-amino acid peptide chain with a molecular weight of 39 052.5 and an isoelectric point (pI) of 6.21; The deduced DoGA3ox protein without transmembrane or signal peptide residues, contained the gibberellin 3-oxidases conserved domains that DIOX_N (40—130) and 2OG-FeII_Oxy (197—299). DoGA3ox had 51%—56% similarity with GA3ox proteins from various plants, and was closely related to the monocot *Allium fistulosum*, *Elaeis guineensis*, and *Phoenix dactylifera*. The relative transcript levels of DoGA3ox were increased at stage 1, then decreased (stage 2), and increased again (stage 3) during *D. officinale* symbiotic/asymbiotic seed germination, the fold change to ungerminated seeds was 13.44 (symbiotic)/5.21 (asymbiotic), 7.28/2.32 and 9.40/6.21, respectively. Moreover, its transcript level was higher in symbiotic germination than that in the asymbiotic status. **Conclusion** The full-length DoGA3ox gene is cloned for the first time, and its expression in different stages during seed germination indicates that DoGA3ox gene plays a crucial role in the regulation of seed germination in *D. officinale*.

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; seed germination; GA3ox; cloning; real time quantitative PCR

收稿日期: 2015-10-10

基金项目: 教育部博士点基金优先发展领域 (20131106130002); 药植所创新团队发展计划 (PIRTI-IT1302); 中央公益性科研院所基本科研业务费专项 (YZ-12-14); 中医药行业科研专项 (201407005)

作者简介: 刘思思 (1988—), 女, 博士在读, 主要从事药用植物分子生物学研究。E-mail: liusisi274@126.com

*通信作者 陈 娟, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事真菌分类及菌根生物学。E-mail: kibchenjuan@126.com
郭顺星, 研究员, 博士生导师, 主要从事药用植物菌根生物学研究。E-mail: sxguo1986@163.com

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 为单子叶植物纲 (Monocotyledoneae) 兰科 (Orchidaceae) 石斛属 *Dendrobium* Sw. 多年生草本植物, 作为中华九大仙草之首, 具有益胃生津、滋阴清热、润肺止咳、明目强身等功效, 是石斛属药用植物中最为珍稀名贵的种^[1-2]。和其他兰科植物一样, 铁皮石斛种子细小如尘, 发育不完全, 仅具尚未分化的原胚, 自然条件下需与合适的菌根真菌共生才能萌发^[3-4]。目前, 铁皮石斛的规模化生产主要采用种苗快繁技术, 而该项技术的关键在于种子的高效萌发。研究表明, 接菌共生萌发可以提高种子的萌发率, 或将成为解决濒危兰科药用植物资源再生的有效途径^[5]。然而, 国内外就铁皮石斛种子萌发的研究集中在非共生萌发培养基的筛选改良^[6-8]和高效共生萌发真菌的筛选方面^[9-10], 而铁皮石斛种子萌发尤其是接菌共生萌发的分子机制尚不明确, 仅有赵明明等^[11-12]通过构建铁皮石斛种子接菌共生萌发抑制差减杂交 (SSH) 文库, 发现大量差异表达基因, 并据此克隆得到 *S*-腺苷甲硫氨酸脱羧酶基因 (SAMDC), 揭示该基因具有受真菌侵染诱导表达的特性, 推测其通过参与多胺调控途径在种子接菌共生萌发中起到信号应答作用, 为后续相关研究提供了基因资源和分子基础。

高等植物的种子萌发是由多种植物激素调节的, 如脱落酸 (ABA)、赤霉素 (GA)、生长素、乙烯、油菜素内酯等, 尤其是 GA 和 ABA 的平衡关系, GA 量的提高能够促进种子解除休眠和发芽, 减弱 ABA 的影响, 同时影响着植株的生长发育^[13]。赤霉素 3-氧化酶 (GA3ox) 和赤霉素 20-氧化酶 (GA20ox) 是 GA 生物合成过程中的关键限速酶, 而赤霉素 2-氧化酶 (GA2ox) 则是 GA 分解代谢时的关键限速酶^[14]。因此, GA20ox、GA3ox 和 GA2ox 基因的表达调控在 GA 内稳态中扮演着至关重要的角色。在 GA 信号途径中, GA2ox 基因转录水平受到 GA 水平的正反馈调控, GA20ox 和 GA3ox 转录水平则是受到 GA 水平的负反馈调控^[15-16]。其中, GA3ox 是一种 α -酮戊二酸依赖性多功能双加氧酶, 催化非 13-羟化途径产生的 GA₉ 和 13-羟化途径产生的 GA₂₀ 经过 3 β -羟基化生成具有生物活性的 GA₄ 和 GA₁^[17-18]。在需光种子莴苣、拟南芥中, 光敏色素信号一般通过靶向调控 GA3ox 和 GA2ox 来改变种子中具有生物活性的 GA 量, 进而调控种子萌发。如莴苣种子中红光诱导 LsGA3ox1 基因表达同时抑

制 LsGA2ox2 基因的表达, 而红外光则可以抵消红光的这一作用^[19]。另有研究发现, 后熟作用可以改变 ABA 和 GA 代谢相关基因 (如 CYP707A2 和 GA3ox1) 的表达, 从而解除种子休眠促进萌发^[20]。由此可见, GA3ox 基因在植物种子萌发中扮演着重要角色。

为阐明铁皮石斛种子萌发机制, 本研究前期对铁皮石斛种子和原球茎进行高通量转录组测序, 发掘了大量的差异表达基因, 这对于兰科植物种子萌发分子机制的研究有着重要意义。鉴于 GA3ox 基因在种子萌发中的重要作用, 笔者选择一条 1 195 bp 的转录本, BlastX 分析显示其注释为 GA3ox, 利用 RACE 技术和 RT-PCR 方法首次从铁皮石斛萌发的种子中克隆得到 GA3ox 基因的 cDNA 全长并对其验证, 同时进行生物信息学及表达模式分析, 旨在为深入研究该基因在铁皮石斛种子萌发及原球茎发育中的生物学作用提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

样品采自浙江金华, 经笔者鉴定为铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 成熟蒴果。促铁皮石斛种子萌发真菌 S6 为胶膜菌属真菌 *Tulasnella* sp.^[21]。在 OMA 培养基^[22]上进行铁皮石斛种子接菌共生萌发实验, 1/2 MS 培养基^[23]上进行非共生萌发实验, 其分别得到萌发至 1~3 级的种子和未萌发种子, 液氮速冻后置 -80 °C 保存备用。种子萌发级别划分参照 Zettler 报道^[24], 种子吸水膨大, 种皮破裂为第 1 级; 种子继续膨大, 并出现顶端分生组织为第 2 级; 顶端分生组织伸长变粗并弯曲为第 3 级。

1.2 RNA 提取和 cDNA 合成

按照 RNeasy[®] Plant Mini Kit (QIAGEN, 德国) 操作说明制备各样品总 RNA, NanoDrop[™] 2000 分光光度计 (Thermo Fisher, 美国) 分析 RNA 质量、纯度, 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。按照 PrimeScript[™] RT Reagent Kit (Takara, 日本) 操作说明, 逆转录合成 cDNA, -20 °C 保存备用。

1.3 RACE 与 qRT-PCR 验证

通过 NCBI 的 BlastX 和 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 分析, 发现一条 1 195 bp 的 Unigene15096 序列被注释为 GA3ox, 且具有完整的开放阅读框 (open readingframe, ORF) 和完整的 5'UTR, 根据此序列设计 1 条基因特异引物, 按照 SMARTer[™] RACE

cDNA Amplification Kit (Clontech, 日本) 说明书进行 3'-RACE PCR 反应。以 1 μg 铁皮石斛原球茎总 RNA 为模板, 利用 SMARTScribeTM Reverse Transcriptase (Clontech, 日本) 进行逆转录合成 3'-RACE ready cDNA。3'-RACE 引物为 DoGA3ox-GSP-F: 5'-TCGCCGTTACCTCCCAACTCAGCCCTTT-3'。DoGA3ox-GSP-F 与 UPM 引物组合, 按照试剂盒中 Program 1 程序进行 3'-RACE。反应体系: 2.0 μL 10 $\times$ Advantage[®] 2 PCR buffer, 10 mmol/L dNTPs 0.4 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ DoGA3ox-GSP-F 0.4 μL , 2.0 μL 10 $\times$ UPM, 1.5 μL 3'-RACE ready cDNA, 5 U/ μL 50 $\times$ Advantage[®] 2 Polymerase Mix 0.4 μL , 补 ddH₂O 至 20 μL 。PCR 产物经电泳分析, 回收目的条带、克隆并测序, 与原序列拼接分析后, 设计 ORF 引物 DoGA3ox-ORF-F: 5'-CCACCAAAGAAATGCCTTCTCTCTC-3' 和 DoGA3ox-ORF-R 5'-GAACCAAAGCCGTTAGTGGA-TTATC-3' 以及 5'-UTR 引物 DoGA3ox-5'UTR-F: 5'-TATTGGGTTGCACTCGTTATCTCTCT-3' 和 DoGA3ox-5'UTR-R: 5'-CGTGGCTGGTGGCATAGAAGAC-3', 以铁皮石斛原球茎 cDNA 为模板, Ex TaqTM DNA 聚合酶 (Takara, 中国) 进行 RT-PCR。反应体系: 2.5 μL 10 $\times$ Ex TaqTM Buffer, 0.5 μL Ex TaqTM DNA Polymerase, 10 mmol/L dNTP Mix 0.5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 正/反向引物 0.5 μL , 1.5 μL cDNA, 补 ddH₂O 至 25 μL 。PCR 程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。PCR 产物经克隆、测序分析以验证基因 cDNA 全长的可靠性。

1.4 基因克隆和序列分析

PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 艾德莱琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒 (艾德莱, 中国) 纯化目的条带, 连接至 pMD18-T vector (Takara, 中国), 转化大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞, 随机挑选 5 个克隆送金唯智公司测序。使用 BlastX、ORF Finder 进行 cDNA 序列分析; InterProScan 和 PROSITE 在线分析 DoGA3ox 蛋白质的结构域和基元; ProtParam 和 SOPMA 分析蛋白质理化性质和二级结构; SignalP 4.1 和 TMHMM 2.0 预测蛋白质信号肽和跨膜区域; PSORT 进行蛋白质亚细胞定位分析。采用 DNASTAR 7.1 进行氨基酸序列对比分析; 借助 MEGA 6.0 构建系统进化树。

1.5 实时荧光定量 PCR 分析

分别用 500 ng 各萌发阶段的种子总 RNA 反转

录成 cDNA, 以铁皮石斛 18 S rRNA 作为内参基因^[25], qPCR 引物 DoGAox-qPCR-F: 5'-CGCCGACCTCCTCCATCAAGTA-3' 和 DoGAox-qPCR-R: 5'-TCTTC-CAGCCAGCTTCTTCATCTCT-3' 的扩增产物长 280 bp。将 cDNA 原液稀释 20 倍作为 qPCR 反应模板。用 LightCycler[®] 480II 实时荧光定量 PCR 仪 (Roche, 瑞士) 进行 qPCR 反应。反应体系 20 μL 包括 10 μL 2 $\times$ SYBR[®] Premix Ex TaqTM (Takara, 中国), 0.4 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 正/反向引物, 2 μL cDNA, 7.2 μL ddH₂O。每个反应 3 个复孔, 3 次生物学重复。PCR 程序 95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 40 个循环。反应结束绘制溶解曲线。根据 LightCycler[®] 480 II HTCl 软件生成的循环阈值 (cycle threshold, Ct), 用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法^[26] 计算相对表达量。

2 结果与分析

2.1 DoGA3ox 基因克隆和全长验证

通过 BlastX 分析比对可知原 Unigene 序列具有完整的 5'-UTR, 经过 3'-RACE 反应, 扩增产生长度约为 800 bp 的目标条带 (图 1), 克隆、测序获得 795 bp 的序列, 与原 unigene 拼接分析获得了一条 1 318 bp 的 cDNA。BlastX 分析表明其与 GenBank 中已注册的多种植物 GA3ox 基因有较高的相似性 (44%~56%), 定名为 DoGA3ox, 提交 GenBank 并获得注册号 KT597694。DoGA3ox 基因的 ORF 长 1 062 bp, 5'-UTR 长 123 bp, 3'-UTR 长 133 bp。分别使用引物 DoGA3ox-5'UTR-F/R 和 DoGA3ox-ORF-F/R, 经 RT-PCR 扩增产生特异目的条带 (图 1), 克隆、测序前者获得一条 337 bp 的序列包含 5'UTR, 后者获得一条 1 129 bp 的序列包含完整 ORF, 两者均与拼接序列一致, 进而验证成功获得 DoGA3ox 基因的全长 cDNA。

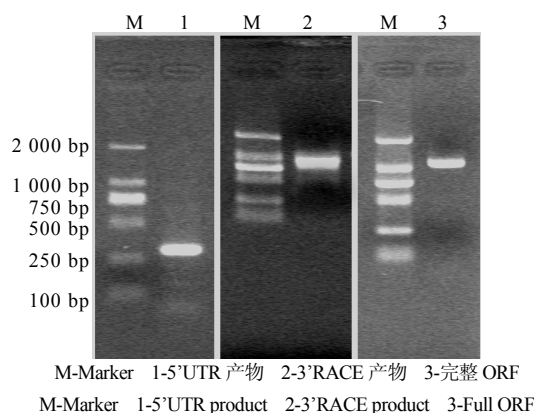


图 1 DoGA3ox 基因全长 cDNA 克隆

Fig. 1 Clone of full length cDNA of DoGA3ox

2.2 DoGA3ox 基因编码蛋白理化特性分析

ProtParam 预测 DoGA3ox 基因编码蛋白的分子式为 $C_{1742}H_{2712}N_{488}O_{507}S_{14}$, 等电点 6.21、相对分子质量 39 052.5; DoGA3ox 蛋白带正电残基 (Arg+Lys) 为 36, 负电残基 (Asp+Glu) 为 43。该蛋白的不稳定系数为 36.70, 脂肪系数为 85.41, 总平均疏水性系数为 -0.218, 负值表示亲水性, 正值表示疏水性, 其介于 -0.5~0.5 为两性氨基酸。利用 ProtScale 对其再次进行亲疏水性预测, 结果显示该蛋白的疏水性最大值为 2.333, 最小值为 -2.311, 疏水性区域与亲水性区域交替出现, 没有典型的亲疏水性区域, 与 ProtParam 预测结果一致, 属于两性氨基酸。SOPMA 分析表明, DoGA3ox 蛋白的二级结构主要由 α 螺旋 (34.84%)、延伸链 (17.56%)、 β 转角 (8.22%) 和随机卷曲 (39.38%) 组成。

2.3 DoGA3ox 蛋白结构域、定位和跨膜区分析

InterProScan 分析显示, DoGA3ox 基因编码蛋白含有保守的 DIOX_N 结构域 (40~130) 和 2OG-FeII_Oxy 结构域 (197~299), 具备已报道^[27-28]植物 GA3ox 的典型结构特征。PROSITE Scan 分析表明, DoGA3ox 蛋白含有数目不等的基元, 包括 3 个蛋白激酶 C 磷酸化位点 (246~248、277~279、342~344)、5 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (46~69、141~144、147~150、204~207、324~327), 3 个 *N*-酰基化位点 (56~61、62~67、102~107), 这些保守基元可能对蛋白结构和功能有重要作用。SignalP 4.1 分析 DoGA3ox 蛋白不含信号肽, 该蛋白不可能在细胞中发生移动。利用 TMHMM 2.0 分析 DoGA3ox 蛋白不含跨膜结构域, 由此推断该蛋白不经过跨膜转运, 与信号肽分析相吻合。PSORT 预测 DoGA3ox 蛋白定位于过氧化物酶体的可能性较高为 63.1%, 定位于线粒体基质的可能性为 10.0%。

2.4 DoGA3ox 蛋白序列比对和进化分析

运用 DNASTAR 7.1 中的 MegAlign 程序对 DoGA3ox 基因编码蛋白与 5 种植物的 GA3ox 蛋白进行多序列比对分析 (图 2)。结果表明, DoGA3ox 与大葱 *Allium fistulosum* L. (BAG32267.1)、油棕 *Elaeis guineensis* Jacq. (XP_010925284.1)、海枣 *Phoenix dactylifera* L. (XP_008785607.1)、野茶树 *Camellia sinensis* L. (AHC32022.1)、蓝猪耳 *Torenia fournieri* L. (BAJ65442.1) GA3ox 蛋白的一致性分别为 55%、56%、54%、51% 和 50%。因此将 DoGA3ox

蛋白序列提交到 NCBI 上进行 Blast P 比对, 搜索相似性序列, 结果显示, DoGA3ox 与油棕 (XP_010925284.1) 的 GA3ox 蛋白序列相似性最高为 56%。

为了分析 DoGA3ox 蛋白的进化情况, 从 NCBI 的 Nr 数据库中选取 16 个物种的 16 条 GA3ox 蛋白序列, 经过 Clustal W 比对并利用 MEGA 6.0 中的 NJ 法构建进化树。这些序列包括大叶藻 *Zostera marina* L. (KMZ69735.1)、芝麻 *Sesamum indicum* L. (XP_011072274.1)、蓝猪耳 (BAJ65442.1)、猴面花 *Erythranthe guttata* (Fischer ex DC.) Nesom (XP_012856205.1)、绒毛状烟草 *Nicotiana tomentosiformis* L. (XP_009596383.1)、马铃薯 *Solanum tuberosum* L. (XP_006341659.1)、野茶树 (AHC32022.1)、案头菊 *Chrysanthemum × morifolium* Ramat. (BAG48320.1)、莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. (XP_010249916.1)、梅花 *Prunus mume* Sieb. et Zucc. (XP_008228615.1)、苹果 *Malus domestica* Borkh. (XP_008377587.1)、白梨 *Pyrus × bretschneideri* Rehd. (XP_009339604.1)、葡萄 *Vitis vinifera* L. (XP_002284981.1)、油棕 (XP_010925284.1)、海枣 (XP_008785607.1) 和大葱 (BAG32267.1)。利用上述植物的 GA3ox 蛋白序列绘制系统进化树 (图 3), DoGA3ox 与单子叶植物大葱、油棕和海枣的 GA3ox 蛋白序列亲缘关系较近, 与芝麻等双子叶植物关系较远。

2.5 DoGA3ox 基因在种子萌发不同阶段的表达分析

分别提取铁皮石斛种子萌发各阶段样品总 RNA, 利用 qPCR 技术检测 DoGA3ox 基因在种子萌发不同阶段的表达。图 4 结果表明, 首先, DoGA3ox 基因在铁皮石斛种子接菌共生萌发过程中, 萌发 1 级至第 3 级的相对表达量分别为未萌发种子的 13.44、7.28 和 9.40 倍; 在非共生萌发时, 其相对表达量则分别为未萌发种子的 5.21、2.32 和 6.21 倍, 均呈现出先升高 (1 级) 后降低 (2 级) 再升高 (3 级) 的趋势。其次, DoGA3ox 基因在共生萌发过程中的表达量高于其在非共生萌发过程中的表达。最后, 分析可知铁皮石斛种子萌发过程中, DoGA3ox 基因表达呈现一定幅度频率的波动, 间接反映种子萌发是一个非常复杂的生理生化过程, 同时亦说明 GA 在种子萌发过程中的重要调节作用。

野茶树	-----KHLDFNSLEELPESHAWTSLEKYS--SDSVETITGTKESVPVIDLNDPNAMELVGHACRTWG	61
蓝猪耳	--SFKSQPPLNV-----HKYLDLSSVKELPETHAWTS-SKLDDEETCDA-----ENVPIIDLNDENALIELIGRACRTWG	67
大葱	MPISIMEQPIHFPQPIHHPKHFDLGSHEVPDSTHTWPTIQPNPENGPN-----ESTIPVIDLSSPDVLSLIGRACBSWG	73
油棕	-----HFQFESTRKVPDASHAWPDLHDHPSVEPSGP-----DSVPVVDLASPDALLVGRACQDFG	55
海枣	-----HFDDESTIREVPDASHAWPDLHDHPSVEPSGP-----DSVPVVDLSDPDALLVGRACQEWG	55
铁皮石斛	MPISLSKE-----HFDLYSAFHVPEHAWSSSLHHDH-----PIAGDGATIPVIDISDPDAASVMVGACRSWG	62
野茶树	VFOVTNHGINTSVLNRVESAGKSLFSLHIOQKLKAARSPEGVSGYGVARISFFPKLMWSEGFTIFG--SPLEHACQLWP	139
蓝猪耳	VFOVINHNIEKSLLEIEFEGKLFSLPMQOKLRAARSPDGVSGYGVARISFFSKLMWSEGFTILG--SVSEHARLLWP	145
大葱	VFOVISHGVLDNLLHNLESQARRLFSLPTQOKLKAGRSPNSISGYGLAPISLFSKLMWSEGFTISG--SPLDHARSLWP	151
油棕	VFOITSHGIPDILLDRLESQIRRLFSLPTHQKLKAARSPGISISGYGLVPISSFFPKLMWSEGFTIAG--SPLEHARKLWP	133
海枣	VFOVTGHGIPDILLDRLESQIRRLFSLPTHQKLKAARSPGDIAGYGLAPISLFSKLMWSEGFTIAG--SPFEHARKLWP	133
铁皮石斛	VFOYATSHGIPADLLHQVESHARRLFSLHLRKLQTAPRDSLSGYGRPEISAFFPKLMWSEGFTLAGHDDHLAVTSQISE	142
野茶树	QDY-SNFCVDVIEEYKEMKILARRLMMLSLDISKED-VKWAGPKG-DFKGANAADVQLNSYPACPEPDRAAGLAHTD	216
蓝猪耳	NDY-NKFCDTIEEYQKAMRLAGRLMMLSLGSLGTTEDDLKWAACKEPDDQGGSAALQLNSYPCPDRAAGLAHTD	224
大葱	DDYF-NFCEVIEEYKEMKRVARLMMLSLSLGLT-EETIKWAGPMN-ELQDISSVLQLNSYPACPNPDRAIGLAHTD	228
油棕	NESYAFCNVIEEYKVMKKLAGRLMMLSLSLGLT-EEDISWAGPTK-DSGDLSTVMQLNSYPACPEPDRAVGLAHTD	211
海枣	KBYCAEFCNVIEEYKVAKELAGRLMMLSLSLGLT-EEDISWAGPIR-DSGDLSAVIQLNSYPACPEPDRAVGLAHTD	211
铁皮石斛	FDSLS-FCEVMEAYRKEMKLAGRLFRLLLSLGL-EEMQGVQGLK-ELSQAADAIQLNSYPTCPEPERAIGMAHTD	219
野茶树	SLLTILYQNN-TSGLEVHRDG-YG----WVTVPPLPDTLVVNVGDLHLILSNGLYPSVLHRAVNRTRHRLSVAYLYGP	290
蓝猪耳	SLLTILHQSNT-SGLQVAREGRAG----WVTVPPLAGALVVHVGDLHLILSNGLYPSVHRAVNRTRHRLSVAYLYGP	299
大葱	SLLTILYQSN-TSGLQVLRPNKESSTQWVTVPPLPGALVVNVGDLCHILSNGRFHSVHRAVNRTRHRYSAAYICGP	307
油棕	SLLTIVLYQSR-TSGLQVLRPD----PFRWVTVPPLPGVLIHVHVGDLSHILSNGRFRSVLHRAVNRTRHRLSAAYICGP	286
海枣	SLLTIVLYQSG-TSGLQVLRPD----PARWVTVPPLPGVLIHVHVGDLSHILSNGRFRSVLHRAVNRTRHRLSAAYICGP	286
铁皮石斛	SAFLTIVLHQTGAGGLQVLRDQDESGSARWVDVLRPDCLVVNVGDLHLILSNGRFHSVHRAVNRTRHRI SAAYFTGP	299
野茶树	PPNVQISPLSKLVDLTHPILYRPVTVTEYLGTAKVYFDKALSSVRL	336
蓝猪耳	PSSVKISPLRKLVDKYHPIYRPITWSEYLGITAKHFDKALTSVRL	345
大葱	PAHVKVSPIVK----PVGPAYRPITWREYLGITAKARLFDKALASVLISEE--D	353
油棕	PAHVKVSPVKKLLGPSQGPAYRAVTVPEYLALKGKLFENALASIKLCEEQWE	338
海枣	PAHVKVSPIDIFLGPSQGPAYRAVTVPEYLALKGKLFENKALASIKLRREQWE	338
铁皮石斛	PAHMKVGSITKLVDMMRTGBMYRPVTVPEYLGITRTRLFDKALDSVKFQKLEKD	353

图 2 DoGA3ox 与其他植物 GA3ox 蛋白的多序列比对

Fig. 2 Multiple sequence alignment of DoGA3ox and GA3ox from other plants

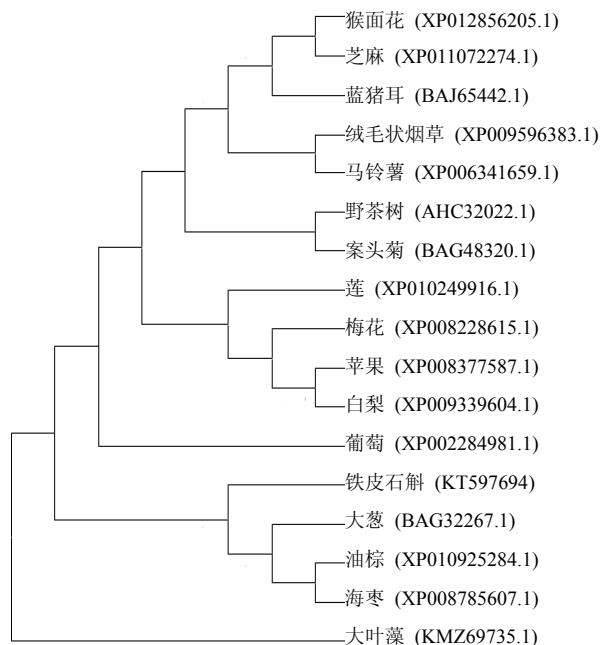


图 3 DoGA3ox 与不同物种 GA3ox 蛋白的进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree of DoGA3ox with GA3ox proteins from other species

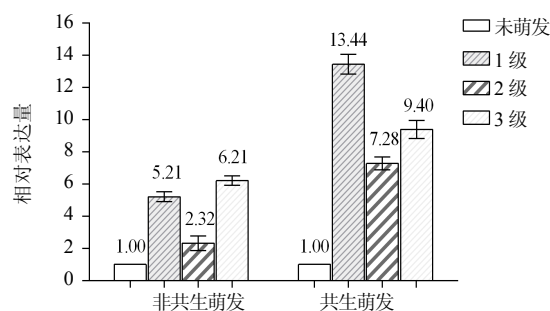


图 4 qRT-PCR 分析 DoGA3ox 基因在种子萌发不同阶段的表达模式

Fig. 4 qPCR analysis on expression pattern of DoGA3ox gene at different germination stages of *D. officinale* seeds

3 讨论

GA3ox 为催化赤霉素生物合成途径的最后关键一步, 是由多基因家族编码的。目前, 该基因已在部分植物中克隆得到, 如南瓜^[29]、拟南芥^[30]、水稻^[31]、烟草^[32]、小麦^[33]等。药用植物中仅见西洋参、滇重楼 GA20ox 基因克隆的相关报道^[12-13], 尚未见

GA3ox 基因克隆的报道。本研究以前期铁皮石斛萌发种子转录组测序拼接获得的一条 GA3ox unigene 为基础, 利用 RACE、RT-PCR 技术首次从珍稀濒危药用铁皮石斛克隆获得一个 GA3ox 基因。通过生物信息学分析了 DoGA3ox 基因编码蛋白的二级结构、三级结构等基本特性, 不存在信号肽和跨膜结构域, 这与报道的西洋参 GA20ox 蛋白^[12]类似。DoGA3ox 基因序列 BlastX 比对结果显示与大葱 (BAG32267.1)、油棕 (XP_010925284.1) 等单子叶植物的 GA3ox 基因序列相似性为 50%~56%, 高于其与双子叶植物 GA3ox 基因序列的相似性 (40%~53%), 与 GA3ox 蛋白进化分析结果一致, 同时也符合植物亲缘关系。通过 qRT-PCR 方法检测 DoGA3ox 基因在铁皮石斛种子接菌共生萌发、非共生萌发各阶段的表达量, 发现 DoGA3ox 基因在种子萌发至幼苗的过程中, 呈现升高降低再升高的趋势, 说明此过程中 GA 调控的复杂性和 GA 合成分解代谢的旺盛, 并由此推测 DoGA3ox 基因可能受到 GA 的负反馈调控。此外, DoGA3ox 基因在共生萌发种子中的表达量高于非共生萌发种子的, 说明促铁皮石斛种子萌发真菌能通过某些方式 (共生信号、分泌 GA 信号途径的中间产物等) 诱导 DoGA3ox 基因表达, 进而提高赤霉素的合成^[34-35], 从而促进种子打破休眠快速萌发。

本研究结果不仅为分析 DoGA3ox 基因的分子功能提供依据, 还为铁皮石斛种子萌发以及菌根真菌促其种子萌发的分子机制研究提供基础。高等植物中 GA3ox 蛋白是由一个小基因家族编码的, 能联合 GA20ox 将 GA₁₂ 和 GA₅₃ 催化合成有活性的 GA₁ 和 GA₄。有研究表明, GA3ox 蛋白至少有 4 个基因编码^[34], 根据 NCBI Blast 序列比对结果, 尚不能确定本研究所得基因为 GA3ox 基因家族中的哪一个成员。为进一步研究 GA3ox 基因在种子萌发中的作用, 在后续研究中还需克隆铁皮石斛 GA3ox 基因家族的其他成员, 分析各成员间的不同以及表达存在的规律。

参考文献

- [1] Zhang G, Song C, Zhao M M, *et al.* Characterization of an A-type cyclin-dependent kinase gene from *Dendrobium candidum* [J]. *Biologia*, 2012, 67: 360-368.
- [2] 张 岗, 胡本祥, 张大为, 等. 铁皮石斛咖啡酰辅酶 A 氧甲基转移酶基因的分离与表达分析 [J]. *中草药*, 2014, 45(8): 1143-1149.
- [3] Zhao M M, Zhang G, Zhang D W, *et al.* ESTs analysis reveals putative genes involved in symbiotic seed germination in *Dendrobium officinale* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72705.
- [4] 刘思思, 陈 娟, 郭顺星. 兰科植物种子萌发的研究进展 [J]. *种子*, 2015, 34(6): 43-50.
- [5] Sebastián F, Vanesa S, Eduardo F, *et al.* Symbiotic seed germination and protocorm development of *Aa achalensis* Schltr., a terrestrial orchid endemic from Argentina [J]. *Mycorrhiza*, 2014, 24(1): 35-43.
- [6] 汪红梅, 罗 鸣. 铁皮石斛种子无菌萌发 [J]. *安徽农业科学*, 2013, 41(7): 2850-2851.
- [7] 徐步青, 李振中, 张 俊, 等. 不同培养条件对铁皮石斛类原球茎生物反应器培养的影响 [J]. *中草药*, 2014, 45(5): 709-713.
- [8] 杨柳平, 刘畅庆, 赵仁发, 等. 铁皮石斛种子诱导原球茎组培快繁体系的研究 [J]. *广东农业科学*, 2012, 39(7): 54-57.
- [9] Dan Y, Meng Z X, Guo S X. Effects of forty strains of orchidaceae mycorrhizal fungi on growth of protocorms and plantlets of *Dendrobium candidum* and *D. nobile* [J]. *Afr J Microbiol Res*, 2012, 6: 34-39.
- [10] 吴慧凤, 宋希强, 刘红霞. 铁皮石斛种子的室内共生萌发 [J]. *生态学报*, 2012, 32(8): 2491-2497.
- [11] 赵明明, 张 岗, 宋 超, 等. 铁皮石斛种子接菌共生萌发抑制差减杂交文库的构建及序列分析 [J]. *中国药理学杂志*, 2013, 48(5): 341-345.
- [12] 赵明明, 张 岗, 张大为, 等. 铁皮石斛 S-腺苷酸脱羧酶基因 DoSAMDC1 的克隆及特征分析 [J]. *药学报*, 2013, 48(6): 946-952.
- [13] 孙同玉, 祝 娟, 孙 鹏, 等. 西洋参赤霉素 20-氧化酶基因的克隆与序列分析 [J]. *中草药*, 2015, 46(11): 1656-1660.
- [14] 徐文娟, 李先恩, 孙 鹏, 等. 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 [J]. *中草药*, 2013, 44(3): 338-343.
- [15] Hytönen T, Elomaa P, Moritz T, *et al.* Gibberellin mediates daylength-controlled differentiation of vegetative meristems in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch) [J]. *BMC Plant Biol*, 2009, 9(1): 18-23.
- [16] Zhang R, Wang Y, Wang C, *et al.* Temporal expression of genes involved in the biosynthesis of gibberellins in birch (*Betula platyphylla*) [J]. *Afr J Biot*, 2013, 10(61): 13046-13050.
- [17] Mitchum M G, Yamaguchi S, Hanada A, *et al.* Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in *Arabidopsis* development [J]. *Plant J*, 2006, 45: 804-818.
- [18] Sun T. The molecular mechanism and evolution of the

- GA-GID1-DELLA signaling module in plants [J]. *Curr Biol*, 2011, 21(9): R338-R345.
- [19] Yamaguchi S. Gibberellin metabolism and its regulation [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, 59: 225-251.
- [20] Yano R, Kanno Y, Jikumaru Y, *et al.* CHOTTO1, a putative double APETALA2 repeat transcription factor, is involved in abscisic acid-mediated repression of gibberellin biosynthesis during seed germination in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2009, 151(2): 641-654.
- [21] Tan X M, Wang C L, Chen X M, *et al.* In vitro seed germination and seedling growth of an endangered epiphytic orchid, *Dendrobium officinale*, endemic to China using mycorrhizal fungi (*Tulasnella* sp.) [J]. *Sci Horticul*, 2014, 165: 62-68.
- [22] Wang H, Fang H, Wang Y, *et al.* In situ seed baiting techniques in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo and *Dendrobium nobile* Lindl.: the endangered Chinese endemic *Dendrobium* (Orchidaceae) [J]. *World J Micro Biotechnol*, 2011, 27(9): 2051-2059.
- [23] 陈晓梅, 李媛媛, 郭顺星. 石斛属植物种子萌发的研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2013, 48(19): 1629-1633.
- [24] Zettler L W, Hofer C J. Propagation of the little club-spur orchid (*Platanthera clavellata*) by symbiotic seed germination and its ecological implications [J]. *Environ Experi Bot*, 1998, 39(3): 189-195.
- [25] 张 岗, 赵明明, 张大为, 等. 铁皮石斛实时定量PCR内参基因的筛选 [J]. 中国药学杂志, 2013, 48(19): 1664-1668.
- [26] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucl Acids Res*, 2001, 29(9): e45.
- [27] 刘 颖, 阳文龙, 郭小丽, 等. *Rht12* 矮秆小麦 *GA3ox* 基因的克隆与表达分析 [J]. 分子植物育种, 2015, 13(2): 241-253.
- [28] 王增辉. 黄瓜赤霉素氧化酶基因 *GA20ox*, *GA2ox*, *GA3ox* 的生物信息学及 *GA20ox1* 功能分析 [D]. 济南: 山东农业大学, 2014.
- [29] Lange T, Robatzek S, Frisse A. Cloning and expression of a gibberellin 2 beta, 3 beta-hydroxylase cDNA from pumpkin endosperm [J]. *Plant Cell*, 1997, 9(8): 1459-1467.
- [30] Yamaguchi S, Smith M W, Brown R G S, *et al.* Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3 β -hydroxylase genes in germinating *Arabidopsis* seeds [J]. *Plant Cell*, 1998, 10(12): 2115-2126.
- [31] Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Sentoku N, *et al.* Cloning and functional analysis of two gibberellin 3 β -hydroxylase genes that are differently expressed during the growth of rice [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 2001, 98(15): 8909-8914.
- [32] Itoh H, Tanaka-Ueguchi M, Kawaide H, *et al.* The gene encoding tobacco gibberellin 3 β -hydroxylase is expressed at the site of GA action during stem elongation and flower organ development [J]. *Plant J*, 1999, 20(1): 15-24.
- [33] Takeda N, Handa Y, Tsuzuki S, *et al.* Gibberellins interfere with symbiosis signaling and gene expression and alter colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in *Lotus japonicus* [J]. *Plant Physiol*, 2015, 167(2): 545-557.
- [34] 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 Regulat*, 2001, 20(4): 319-331.
- [35] Hedden P, Phillips A L. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes [J]. *Trends Plant Sci*, 2000, 5(12): 523-530.