

• 药材与资源 •

太子参 2 个赤霉素 2-氧化酶基因的克隆与序列分析

丁 铃, 江维克*, 周 涛, 李 军, 郑 伟, 龙登凯, 肖承鸿

贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550002

摘 要: 目的 克隆太子参 *Pseudostellariae Radix* 赤霉素 2-氧化酶 (gibberellin 2-oxidase, GA2ox) 基因, 并进行生物信息学和表达分析。方法 通过对太子参转录组数据库的分析, 得到 2 个太子参 GA2ox 基因 PhGA2ox1 和 PhGA2ox8。采用反转录 PCR (RT-PCR) 和特异 PCR 技术获得 2 个基因的蛋白编码区 (coding sequence, CDS), 并对其编码的蛋白进行生物信息学分析。采用实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测基因的表达模式。结果 生物信息学分析表明, PhGA2ox1 和 PhGA2ox8 的 CDS 区分别长 981 和 1 056 bp, 编码 326 和 351 个氨基酸残基, 蛋白相对分子质量分别为 36 871.3 和 40 169.9, 理论等电点为 8.66 和 6.91, 具有 GA2ox 的保守结构域 DIOX_N 和 20G-Fell_Oxy, 但均无明显疏水区, 无跨膜结构域, 无信号肽, 为稳定蛋白。序列系统进化分析显示植物 GA2ox 蛋白可被分为 3 个亚类, PhGA2ox1 和 PhGA2ox8 分别归入 Class I 和 Class III 亚类。qPCR 分析显示, PhGA2ox1 在不同组织器官中的表达基本恒定, 而 PhGA2ox8 在块根木质部的表达量却显著高于在其他组织器官中的表达量 ($P < 0.05$)。结论 首次获得 PhGA2ox1 和 PhGA2ox8 基因的编码区序列, 为进一步分析 2 个基因在太子参生长发育过程中的作用奠定了基础。

关键词: 太子参; 赤霉素 2-氧化酶; 基因克隆; 生物信息学分析; 基因表达分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)15-3145-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.15.021

Molecular cloning and sequence analysis of two GA2ox genes in *Pseudostellariae Radix*

DING Ling, JIANG Wei-ke, ZHOU Tao, LI Jun, ZHENG Wei, LONG Deng-kai, XIAO Cheng-hong

Guiyang University of Chinese Medicine, Guiyang 550002, China

Abstract: Objective To clone the gibberellin 2-oxidase (GA2ox) genes from *Pseudostellaria heterophylla* and perform the bioinformatic and expression mode analysis. **Methods** According to *P. heterophylla* transcriptome annotation, two transcript codings of GA2ox were identified. The full-length cDNA PhGA2ox1 and PhGA2ox8 were determined using RT-PCR. Then the bioinformatic analysis of these genes and encoded proteins were performed. The coding sequences of PhGA2ox1 and PhGA2ox8 were amplified by PCR. And then analyzed the bioinformation of these sequences. The expression levels of PhGA2ox1 and PhGA2ox8 were analyzed using qPCR. **Results** Bioinformatic analysis showed that PhGA2ox1 contained 981 bp and encoded a predicted protein of 326 amino acids with molecular weight of 36 871.3 and isoelectric point (PI) of 8.66; PhGA2ox8 contained 1 056 bp and encoded a predicted protein of 351 amino acids with molecular weight of 40 169.9 and PI of 6.91. Both PhGA2ox1 and PhGA2ox8 contained GA2ox conserved domains DIOX_N and 20G-Fell_Oxy, without obvious hydrophobic region, transmembrane domain and signal peptide. Phylogenetic analysis showed that the GA2ox of plant could be divided into three classes, PhGA2ox1 belongs to Class I and PhGA2ox8 belongs to Class III. The qPCR showed that the expression of PhGA2ox1 in different tissues and organs of *P. heterophylla* was constant, but the expression of PhGA2ox8 in root xylem was significantly higher than that in other tissues and organs ($P < 0.05$). **Conclusion** The PhGA2ox1 and PhGA2ox8 genes are cloned for the first time, and provide a foundation for they may play an important role in the growth and development process of *P. heterophylla*.

Key words: *Pseudostellariae Radix*; gibberellins 2-oxidase; gene clone; bioinformatics analysis; expression analysis

太子参为石竹科植物孩儿参 *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm. 的干燥块根, 主要来自人工栽培。太子参的栽培以块根无性繁殖为主, 但易产生种性退化和病毒、病菌的感染,

收稿日期: 2017-02-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81460579, 81160501); 施秉中药材产业科技合作专项计划项目 [施中药科合专项 (2014) 第 6 号]; 贵州省研究生工作站建设项目 (黔教研合 JYSZ 字 [2014] 016)

作者简介: 丁 铃 (1990—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药资源鉴定与质量控制研究。Tel: 15285135826 E-mail: dingling5826@163.com

*通信作者 江维克 (1962—), 男, 教授, 主要从事中药资源及栽培研究。E-mail: jwk_88@163.com

利用太子参种子有性繁殖可有效地脱毒复壮、改善种性,然而种子具有生理休眠的现象^[1],因此有效打破休眠成为实施太子参有性繁殖的技术关键;另一方面,太子参形成块根的多少及其形态大小,决定了太子参药材的产量和质量^[2]。因此,解析太子参种子休眠和块根膨大的生理机制和影响因素,对改善太子参种植模式和增产提质具有理论和实践意义。

赤霉素(gibberellin, GA)是植物生长发育过程中的重要激素,在打破种子休眠、促进萌发及块根的形成等方面具有重要的作用^[3-4]。赤霉素的生物合成主要分为 3 步:首先牻牛儿苗基焦磷酸(geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP)在质体内被催化环化为内根-贝壳杉烯(ent-kaurene);然后在内质网上经一系列氧化形成 GA₁₂-醛(GA₁₂-aldehyde),根据 C-13 是否羟基化分别形成 GA₅₃ 与 GA₁₂;最后在细胞质中经赤霉素 20-氧化酶(gibberellin 20-oxidases, GA20ox)、赤霉素 3-氧化酶(gibberellin 3-oxidases, GA3ox)氧化形成不同的 GAs。目前,已发现的赤霉素共有 136 种,但仅有 GA₁、GA₃、GA₄ 和 GA₇ 等具有生物活性^[5-6]。赤霉素 2-氧化酶(gibberellin 2-oxidase, GA2ox)是一种依赖 2-酮戊二酸和氧分子作为辅底物、Fe²⁺和抗坏血酸为辅因子的双加氧酶,主要通过 C-2 位的羟基化反应将有生物活性的 GAs 和其前体转变成不可逆的无活性 GAs 形式,从而降低植物组织中活性 GAs 的量,是赤霉素代谢过程中的关键酶之一^[7]。目前研究发现,通过调控 GA2ox 基因的表达可明显影响植物的生长发育,如西洋参种子在打破休眠的过程中 PqGA2ox 基因表达量明显降低^[8];烟草中过量表达的 AtGA2ox7 和 AtGA2ox8 引起转基因植物矮化^[9]。

本研究通过生物信息学分析对太子参转录组测序获得的 unigenes 序列进行检索,得到 2 条 GA2ox 基因序列,分别设计特异引物对其 CDS 区进行克隆验证、生物信息学及表达分析,初步探索太子参 GA2ox (PhGA2ox) 基因的结构特点及其表达规律,为研究太子参生长发育过程中赤霉素的代谢调控奠定基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

太子参样品采集于贵州施秉太子参种质资源圃,经贵阳中医学院江维克教授鉴定为石竹科植物孩儿参 *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax et Hoffm.。洗净后立即将叶、茎、块根韧皮部、

块根木质部、须根分离,并用液氮速冻后于 -80 °C 冰箱中保存,备用。

1.2 试剂

质粒载体 pMD19-T、TaKaRa Ex Taq 酶、反转录酶 M-MLV、RNAiso Plus 试剂盒、DNase I、DL 2000 DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司,GoTaq[®] qPCR Master Mix 购自 Promega 公司,凝胶回收试剂盒购自 Omega 公司, *Escherichia coli* DH5 α 购自天根生化科技(北京)有限公司。其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 总 RNA 的提取与第一链 cDNA 的合成

取 -80 °C 保存的太子参材料于预冷的研钵中,加液氮迅速研磨成粉末状,根据 RNAiso Plus 试剂盒操作方法提取总 RNA。按照 DNase I 使用说明对总 RNA 进行纯化,除去残留的微量 DNA。经琼脂糖凝胶电泳和核酸定量仪检测,选择完整性好, A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.8~2.0 的样品按照 M-MLV 使用说明进行反转录,生成第一链 cDNA。

2.2 基因克隆

根据太子参转录组数据库得到的 2 条 GA2ox 基因序列,分别以起始密码子和终止密码子为起点设计 2 对特异引物 PhGA2ox1-F/PhGA2ox1-R 和 PhGA2ox8-F/PhGA2ox8-R (表 1),以反转录生成的第一链 cDNA 为模板,按照以下体系进行扩增: TaKaRa Ex Taq (5 U/ μ L) 0.125 μ L, 10 $\times$ Ex Taq Buffer (Mg²⁺ Plus) 2.5 μ L, dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 2 μ L, cDNA 1 μ L, 上下游引物各 1 μ L (10 表 1 PhGA2ox1 和 PhGA2ox8 基因克隆及表达分析引物名称及序列

Table 1 Primers used to isolate and analyze expression of PhGA2ox1 and PhGA2ox8

引物	序列 (5'-3')
PhGA2ox1-F	ATGGTGATCTTGTCAAAACCAGG
PhGA2ox1-R	TCAGGAGGCAGCAATTTTCTCAAAG
PhGA2ox8-F	ATGGATATTAATCTAGACGGATCAGAG
PhGA2ox8-R	TTAACCGCATATAAGGAAACGAGG
PhGA2ox1-qF	TATGTGCGGGAAGTGAAGAG
PhGA2ox1-qR	GGGCATGGTGGATAGTGATT
PhGA2ox8-qF	TGGTGAGTAACAGCGAGGAG
PhGA2ox8-qR	TCGAGATATTCCGTGGTTCA
PhACT2-F	CTTCCGATTCTGCTCAAAG
PhACT2-R	GGGATCTCACCGATCATCTC

μmol/L), 灭菌蒸馏水补足至 25 μL。反应程序: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 53 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 3 min, 35 个循环, 72 °C 后延伸 10 min。反应产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 切取目的条带经 Omega 凝胶回收试剂盒回收。回收片段重组入 pMD19-T 载体, 转化 DH5α 感受态细胞, 在含有氨苄的 Luria-Bertanil (LB) 平板上进行培养, 选取多个阳性克隆送往南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。

2.3 生物信息学分析

通过 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的 Blastp 搜索蛋白质数据库, 进行序列相似分析。NCBI conserved domains (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 和 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>) 预测结构域, ExPASy Proteomics Server 的在线软件 ProtParam

(<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 对蛋白进行理化性质的分析和预测, ExPASy ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 进行疏水性预测, TMHMM Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测跨膜区, SignalP4.1Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽, SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sop_ma.html) 预测蛋白的二级结构, SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 构建三维模型。通过 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载植物的 GA2ox 氨基酸序列 (表 2), 并利用 MEGA 4.0 软件采用邻接 (neighbor-joining, NJ) 法构建系统发育树, 通过 ClustalX1.8 软件将 PhGA2ox1 与 PhGA2ox8 推导的氨基酸序列与其他植物的 GA2ox 基因进行多重比较分析。

表 2 植物 GA2ox 氨基酸序列信息

Table 2 Information of GA2ox amino acid sequences

序列名称	物种	登录号	序列名称	物种	登录号
AtGA2ox1	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_177965	GhGA2ox2	棉 <i>Gossypium hirsutum</i>	AEK70418
AtGA2ox2		NP_174296	MdGA2ox1	苹果 <i>Malus domestica</i>	NP_001281028
AtGA2ox3		NP_181002	StGA2ox1	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	NP_001275011
AtGA2ox4		NP_175233	NsGA2ox8	美花烟草 <i>Nicotiana glauca</i>	NP_001289506
AtGA2ox6		NP_171742	NtGA2ox3	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	ABO70985
AtGA2ox7		NP_175509	AlGA2ox3	玉山筷子芥 <i>Arabidopsis lyrata</i>	XP_002879502
AtGA2ox8		NP_193852	AlGA2ox4		XP_002891403
PqGA2ox	西洋参 <i>Panax quinquefolius</i>	AIL25679	ClGA2ox1	荔波连蕊茶 <i>Camellia lipoensis</i>	AHZ13202
InGA2ox1	大花牵牛 <i>Ipomoea nil</i>	ACZ64507	DkGA2ox2	柿子 <i>Diospyros kaki</i>	AID65071
InGA2ox2		ADF42513	VvGA2ox7	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	AGQ42619
SlGA2ox2	番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	NP_001234338	GsGA2ox8	野大豆 <i>Glycine soja</i>	KHN35200
CsGA2ox1	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	NP_001292640	BvGA2ox8	甜菜 <i>Beta vulgaris</i>	XP_010686973
CsGA2ox2		NP_001292648	RpGA2ox1	<i>Rumex palustris</i>	ABG46322
NoGA2ox2	夹竹桃 <i>Nerium oleander</i>	AAT92094	RpGA2ox2		ABG46323
TcGA2ox8	可可 <i>Theobroma cacao</i>	XP_007045566			

2.4 基因表达分析

利用 Primer Premier 5 分别设计 PhGA2ox1 和 PhGA2ox8 的定量 PCR 引物 PhGA2ox1-qF/PhGA2ox1-qR 和 PhGA2ox8-qF/PhGA2ox8-qR, 扩增片段长度分别为 149 bp 和 105 bp。以太子参 PhACT2 基因作为内参基因 (PhACT2-F/PhACT2-R) [10]。按照试剂盒 GoTaq® qPCR Master Mix 说明书进行 qPCR。每个样本 3 个生物学重复和 3 个技术重复, 利用 ABI 7500 Real Time PCR System 系统自带软件进行分析。

3 结果与分析

3.1 PhGA2ox1 与 PhGA2ox8 基因的克隆

通过对太子参转录组数据分析, 找到 2 条与 GA2ox 相关的 unigene, 分别命名为 PhGA2ox1 和 PhGA2ox8。以太子参总 RNA 反转录得到的第一链 cDNA 为模板对其 CDS 区进行克隆。测序结果显示 PhGA2ox1 和 PhGA2ox8 的 CDS 区分别长 981 bp 和 1 056 bp (图 1), GenBank 登录号分别为 KX343933 和 KX343934。

3.2 生物信息学分析

3.2.1 PhGA2ox1 和 PhGA2ox8 序列结构分析

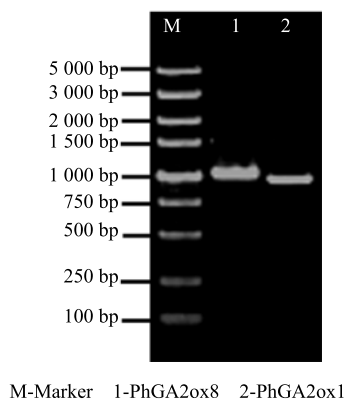


图 1 PhGA2ox1 和 PhGA2ox8 基因的电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of PhGA2ox1 and PhGA2ox8 genes

表 3 PhGA2ox1 和 PhGA2ox8 的氨基酸组成信息比较

Table 3 Comparison on amino acid composition information of PhGA2ox1 and PhGA2ox8 genes

氨基酸序列	酸性氨基酸/%	碱性氨基酸/%	亲水性氨基酸/%	疏水性氨基酸/%
PhGA2ox1	11.32	12.54	24.77	27.53
PhGA2ox8	11.64	11.37	28.69	27.71

3.2.2 同源性分析及结构域预测 将 PhGA2ox1 和 PhGA2ox8 的氨基酸序列进行 Blastp 比对, 发现 PhGA2ox1 与 *R. palustris* (RpGA2ox1、ABG46322, RpGA2ox2、ABG46323), 荔波连蕊茶 (ClGA2ox1、AHZ13202), 黄瓜 (CsGA2ox1、NP_001292640) 的相似性分别为 71%、70%、69%、69%, PhGA2ox8 与 甜菜 (BvGA2ox8、XP_010686973), 菠菜 (SoGA2ox3、AAX14674), 野生大豆 (GsGA2ox8、KHN35200), 葡萄 (VvGA2ox、AGQ42619) 的相似性分别为 70%、68%、65%、65%。并且 PhGA2ox1 和 PhGA2ox8 有着 GA2-氧化酶蛋白家族共同的结

PhGA2ox1 编码 326 个氨基酸残基, 起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TGA; PhGA2ox8 编码 351 个氨基酸, 起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TAA。在 PhGA2ox1 推导的氨基酸序列中出现频率最高的是丝氨酸为 8.26%, 最低的是色氨酸, 仅有 3 个, 占比为 0.92%; PhGA2ox8 推导的氨基酸中出现频率最高的是亮氨酸为 10.23%, 最低的同样是色氨酸, 仅有 5 个, 占比为 1.42%。PhGA2ox1 中碱性氨基酸量较酸性氨基酸的高, 疏水性氨基酸量较亲水性氨基酸的高, 而 PhGA2ox8 则正好相反, 酸性氨基酸和亲水性氨基酸量较高, 具体结果见表 3。

构特点, 均含有异青霉素 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-FelI_Oxy, IPR005123) 保守结构域 (图 2), 以及高度保守的 2-酮戊二酸结合位点 (PhGA2ox1: Arg-264、Ser-266; PhGA2ox8: Arg-295、Ser-297) 和 Fe^{2+} 结合位点 (PhGA2ox1: His-197、Asp-199、His-254; PhGA2ox8: His-229、Asp-231、His-285) (图 3)。

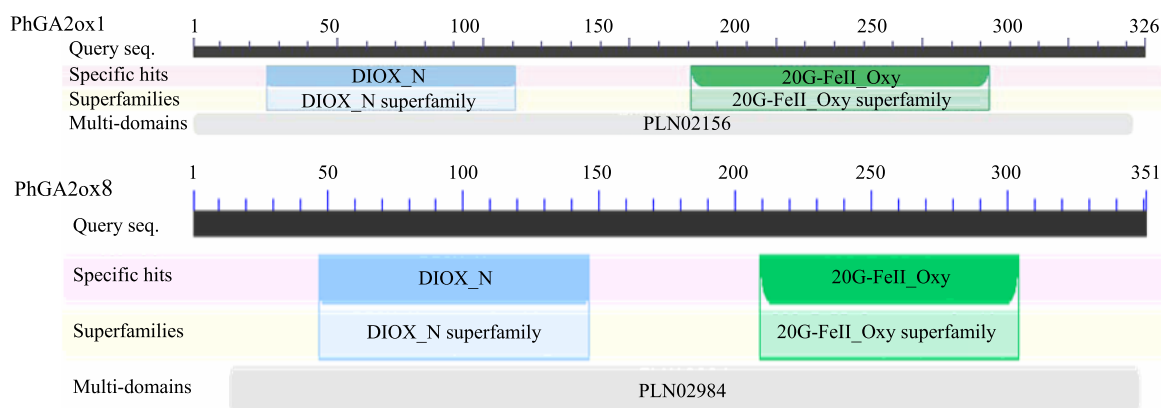


图 2 PhGA2ox1 和 PhGA2ox8 蛋白的保守结构域预测

Fig. 2 Prediction of conserved domains of PhGA2ox1 and PhGA2ox8 proteins

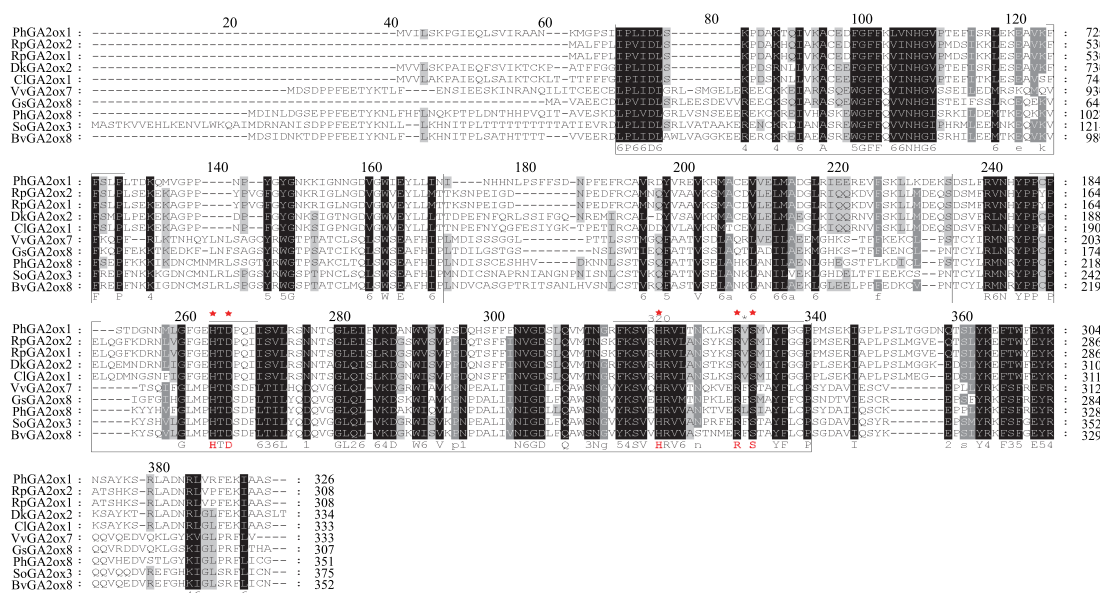


图 3 PhGA2ox1 和 PhGA2ox8 与其他植物 GA2ox 蛋白的多序列比较

Fig. 3 Multiple sequence alignment of PhGA2ox1, PhGA2ox8, and GA2ox from other plants

3.2.3 蛋白的基本理化性质分析 运用 ExPASy Proteomics Server 的在线软件 ProtParam 对 PhGA2ox1 和 PhGA2ox8 基因编码的蛋白质进行理化性质的分析和预测。结果显示, PhGA2ox1 蛋白质的分子式为 C₁₆₅₉H₂₅₈₃N₄₄₇O₄₇₇S₁₄, 相对分子质量为 36 871.3, 理论等电点 8.66。其中正电荷氨基酸残基 (Arg+Lys) 数目为 41, 负电荷氨基酸残基 (Asp+Glu) 数目为 37, 脂肪系数为 80.95, 蛋白质不稳定系数为 35.64, 亲水指数为-0.306, 预测该蛋白为亲水性蛋白。PhGA2ox8 蛋白质的分子式为 C₁₈₀₃H₂₈₀₀N₄₈₄O₅₂₅S₁₆, 相对分子质量为 40 169.9, 理论等电点 6.91。其中正电荷氨基酸残基 (Arg+Lys) 数目为 40, 负电荷氨基酸残基 (Asp+Glu) 数目为

41, 脂肪系数为 84.10, 蛋白质不稳定系数为 41.83, 亲水指数为-0.383, 预测该蛋白为亲水性蛋白。蛋白疏水性预测结果显示, PhGA2ox1 的疏水性最大值为 1.644, 最小值为-2.200, PhGA2ox8 的疏水性最大值为 1.911, 最小值为-3.144, 两者的亲水氨基酸量均较高, 都具有较强的亲水性 (图 4)。2 个蛋白均不具有明显的跨膜区, 无信号肽序列, 为非分泌蛋白。

3.2.4 二级结构分析及结构预测 利用 SOPMA 预测 PhGA2ox1 和 PhGA2ox8 的二级结构 (图 5)。PhGA2ox1 二级结构中 α-螺旋 (蓝色) 占 27.3%、延伸链 (红色) 占 24.54%、β-折叠 (绿色) 占 10.74%、无规卷曲 (紫色) 占 37.42%。PhGA2ox8 二级结构

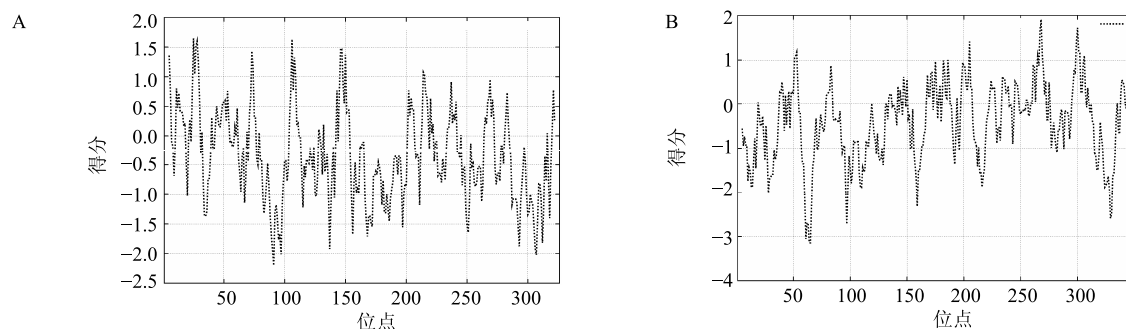
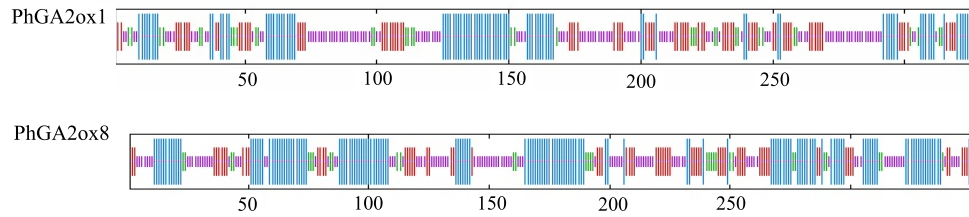


图 4 PhGA2ox1 (A) 和 PhGA2ox8 (B) 蛋白的疏水性预测

Fig. 4 Hydrophobicity analysis on PhGA2ox1 (A) and PhGA2ox8 (B) encoding proteins



竖线由长到短依次为 α -螺旋 (蓝色)、延伸链 (红色)、 β -折叠 (绿色)、无规卷曲 (紫色)

The line from long to short showed that alpha helix (blue), extended strand (red), beta turn (green), random coil (purple)

图 5 PhGA2ox1 和 PhGA2ox8 蛋白的二级结构预测

Fig. 5 Secondary structure prediction of PhGA2ox1 and PhGA2ox8 proteins

中 α -螺旋 (蓝色) 占 40.17%、延伸链 (红色) 占 19.94%、 β -折叠 (绿色) 占 9.12%、无规卷曲 (紫色) 占 30.77%。PhGA2ox1 和 PhGA2ox8 中主要结构均为 α -螺旋和无规卷曲, 其中 PhGA2ox8 的 α -螺旋显著高于 PhGA2ox1 中的比例。 α -螺旋是最为稳定的蛋白质空间结构, 主要对蛋白质骨架起稳定作用, 普遍存在与各类蛋白质中, 常位于蛋白质的表面, 由此推测, PhGA2ox8 的结构可能比 PhGA2ox1 更稳定。无规卷曲结构则决定了蛋白质, 尤其是酶的功能部位常常位于这种构象区域。

3.2.5 三维结构预测 通过在线软件 SWISS-MODEL 分别对 PhGA2ox1 和 PhGA2ox8 编码蛋白进行三维模型的构建。PhGA2ox1 以拟南芥花青素合成酶 (PBD, NO.1gp4.1.A) 为模板建模, 相似性为 26.89%。PhGA2ox8 以拟南芥无色花色素双加氧酶 (PBD, NO.2brt.1.A) 为模板建模, 与该模型相似性为 28.32%。拟南芥花青素合成酶和无色花色素双加氧酶均属于 20G-Fell_Oxy 家族和 DIOX_N 家族 (图 6)。

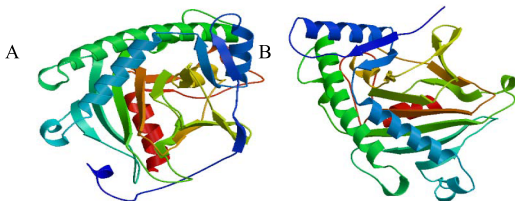


图 6 PhGA2ox1 (A) 和 PhGA2ox8 (B) 蛋白三级结构预测

Fig. 6 Tertiary structure prediction of PhGA2ox1 (A) and PhGA2ox8 (B) proteins

3.2.6 序列系统进化分析 为了分析 PhGA2ox1 和 PhGA2ox8 的进化情况, 从 NCBI 数据库中选取了 17 个种的 29 条 GA2ox 序列, 利用 MEGA 4.0 软件, 采用 NJ 法构建系统进化树。聚类结果显示, 植物 GA2ox 可被分为 3 类, PhGA2ox1 属于 Class I 与

R. palustris 的 RpGA2ox1 和 RpGA2ox2 亲缘关系最近, PhGA2ox8 分别属于 Class III 与甜菜的 BvGA2ox8 亲缘关系最近 (图 7)。

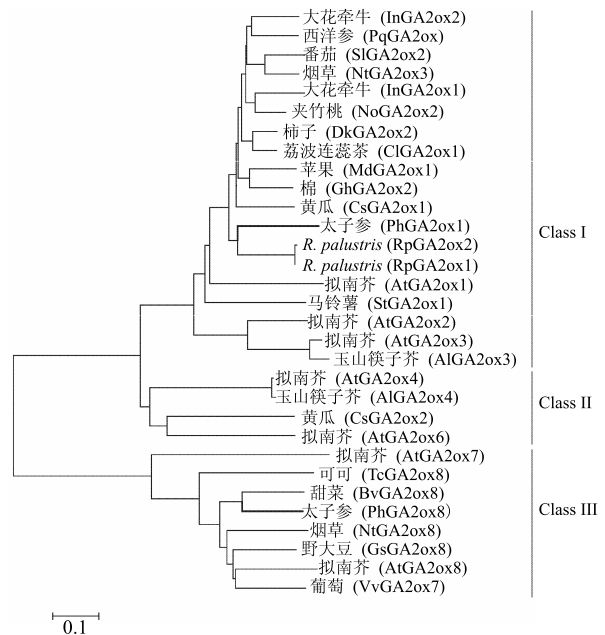


图 7 PhGA2ox1 和 PhGA2ox8 与其他 GA2ox 氨基酸序列的进化树分析

Fig. 7 Phylogenetic tree of PhGA2ox1 and PhGA2ox8 with GA2ox proteins from other species

3.3 基因表达分析

利用 qPCR 技术分析 PhGA2ox1 和 PhGA2ox8 在太子参叶、茎、块根木质部、块根韧皮部及须根中的表达情况, 发现 2 个基因在不同组织器官中均有表达, 但表达模式存在一定的差异。PhGA2ox1 在不同组织器官中的表达基本恒定, 而 PhGA2ox8 在块根木质部的表达量显著高于在叶、茎、块根韧皮部及须根中的表达量 ($P < 0.05$), 并且达到 PhGA2ox1 在块根木质部表达量的 5.7 倍 (图 8)。

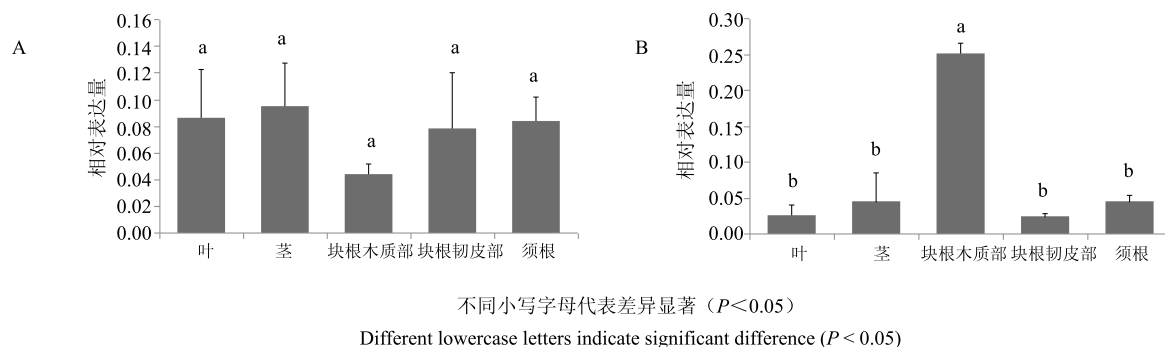


图 8 PhGA2ox1 (A) 和 PhGA2ox8 (B) 基因在太子参不同组织器官中的表达模式

Fig. 8 Expression pattern of PhGA2ox1 (A) and PhGA2ox8 (B) genes at different tissues and organs

4 讨论

植物中 GA2ox 是一个小基因家族,由多个基因编码,如目前已从拟南芥中分离得到 8 个 GA2ox 基因^[11-12],从豌豆中分离得到 2 个 GA2ox 基因^[13]。本研究通过对构建的太子参转录组数据库进行分析、克隆,得到太子参的 2 个 GA2ox 基因,分别命名为 PhGA2ox1 和 PhGA2ox8。同源分析结果显示 2 个基因与其他植物 GA2ox 基因的同源性最高分别能达到 71% 和 70%,并且均含有 DIOX-N 和 20G-Fell_Oxy 保守结构域,以及高度保守的 2-酮戊二酸和 Fe^{2+} 结合位点,因此推测 2 个基因都属于 GA2ox 基因家族的成员。

根据催化底物的不同,GA2ox 基因家族可被分为 3 类:第 1 类主要使 C_{19} -GA (GA_1 和 GA_4) 失活;第 2 类使 C_{19} -GA 的前体 (GA_9 和 GA_{20}) 失活;第 3 类可使 C_{20} -GA 的前体 (GA_{12} 和 GA_{53}) 2β -羟基化^[14-15]。如,模式植物拟南芥的 8 个 GA2ox 基因中 AtGA2ox1、AtGA2ox2 和 AtGA2ox3 属于第 1 类,AtGA2ox4 和 AtGA2ox6 属于第 2 类,AtGA2ox7 和 AtGA2ox8 属于第 3 类。本研究将 PhGA2ox1 和 PhGA2ox8 与其他 17 种植物的 29 条 GA2ox 序列进行系统进化分析,结果显示与前人的研究类似,同样可被分为 Class I、Class II 和 Class III 3 类。PhGA2ox1 与 AtGA2ox1、AtGA2ox2 和 AtGA2ox3 聚于 Class I 分支,属于上述第 1 类。现有研究表明,AtGA2ox2 在光的调控下可以使 GA 失活,抑制拟南芥种子的萌发^[16],因此推测 PhGA2ox1 可能通过催化 GA_1 和 GA_4 失活,从而降低太子参种子中活性 GAs 的量,抑制太子参种子的萌发。PhGA2ox8 与 AtGA2ox7 和 AtGA2ox8 聚于 Class III 分支,属于上述第 3 类,主要以 GA_{12} 和 GA_{53} 为催化底物。在本研究的基因表达分析结果中显示,PhGA2ox8 在

太子参块根的木质部有大量表达,显著高于其他组织器官 ($P < 0.05$),已有研究表明,GA 是目前已知的唯一能有效抑制块根膨大的激素,能显著抑制马铃薯的块茎和甘薯块根的膨大^[17-18]。因此,推测 PhGA2ox8 主要通过催化太子参块根中以 GA_{12} 和 GA_{53} 为前体的 GAs 失活,从而促进了太子参块根的膨大。

赤霉素、细胞分裂素、生长素、乙烯、脱落酸等是调控植物生长发育的生物调节剂,对植物均具有其独特的生理效应。太子参赤霉素代谢关键酶基因 PhGA2ox1 和 PhGA2ox8 的成功克隆,可被作为后续调控的靶标为快速打破种子休眠、促进块根膨大,调整太子参的栽培模式以及通过遗传改良等培育出符合市场需求的太子参商品提供前期研究基础。

参考文献

- [1] 肖承鸿,江维克,周涛,等.太子参种子休眠机制与萌发特性的研究[J].中国中药杂志,2012,37(14):2067-2070.
- [2] 康传志.太子参商品规格与生态适宜区划研究[D].贵阳:贵阳中医学院,2015.
- [3] 庆钟,李发明,朱淑娟,等.不同处理对沙生针茅种子萌发的影响[J].生态学杂志,2016,35(1):63-71.
- [4] 李恒锐,祝建坤,邱文武,等.木薯内源赤霉素含量与块根淀粉积累的关系[J].湖北农业科学,2015,54(7):1628-1632.
- [5] Silverstone A L, Sun T P. Gibberelins and the green revolution[J]. Trends Plant Sci, 2000, 5(1): 1-2.
- [6] Eriksson S, Böhlenius H, Moritz T, et al. GA_4 is the active gibberellin in the regulation of *LEAFY* transcription and *Arabidopsis* floral initiation[J]. Plant Cell, 2006, 18(9): 2172-2181.
- [7] 石海燕,张玉星.高等植物赤霉素 2-氧化酶基因的克隆、表达及其调控[J].生命的化学,2011,31(1):

- 120-123.
- [8] 孙同玉, 祝 娟, 孙 鹏, 等. 西洋参PqGA2ox基因的克隆与序列分析 [J]. 中草药, 2014, 45(24): 3599-3606.
- [9] Schomburg F M, Bizzell C M, Lee D J, *et al.* Overexpression of a novel class of gibberellin 2-oxidases decreases gibberellin levels and creates dwarf plants [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(1): 151-163.
- [10] 丁 铃, 李 军, 周 涛, 等. 太子参 3 个肌动蛋白基因片段的克隆与序列分析 [J]. 中草药, 2016, 47(11): 1935-1942.
- [11] Thomas S G, Phillips A L, Hedden P. Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation [J]. *P Natl Acad Sci Usa*, 1999, 96(8): 4698-4703.
- [12] Hedden P, Phillips A L. Manipulation of hormone biosynthetic genes in transgenic plants [J]. *Curr Opin Biotech*, 2000, 11(2): 130-137.
- [13] 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.
- [14] Rieu I, Eriksson S, Powers S J, *et al.* Genetic analysis reveal that C₁₉-GA2-oxidation is a major gibberellin inactivation pathway in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2008, 20(9): 2420-2436.
- [15] Sakamoto T, Miura K, Itoh H, *et al.* An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their rheir mutants in rice [J]. *Plant Physiol*, 2004, 134(4): 1642-1653.
- [16] Yamauchi Y, Takeda-Kamiya 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.
- [17] Kloosterman B, Navarro C, Bijsterbosch G, *et al.* *StGA2ox1* is induced prior to stolon swelling and controls GA levels during potato tuber development [J]. *Plant J*, 2007, 52(2): 362-373.
- [18] 王庆美, 张立明, 王振林. 甘薯内源激素变化与块根形成膨大的关系 [J]. 中国农业科学, 2005, 38(12): 2414-2420.