

• 药材与资源 •

当归抽薹开花过程中赤霉素代谢水平及其关键酶基因克隆与表达分析

刘 迪¹, 崔秀文¹, 黄天苗¹, 李美玲¹, 栗孟飞^{1*}, 魏建和^{2*}

1. 甘肃农业大学生命科学技术学院 干旱生境作物学国家重点实验室, 甘肃 兰州 730070

2. 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 对当归 *Angelica sinensis* 16 个赤霉素 (gibberellins, GAs) 进行含量测定、GAs 代谢酶基因筛选并进行生物信息学分析、关键基因克隆及表达验证, 以期调控当归抽薹开花提供理论依据。方法 利用 HPLC-MS/MS 对不同材料中 GAs 含量进行测定与分析, 基于当归全长转录组筛选直接参与 GAs 代谢酶基因, 利用在线工具进行生物信息学分析, 并对关键酶基因 *GA2ox6* 和 *GA20ox1* 表达水平进行 qRT-PCR 检测。结果 在所测定的 16 个 GAs 中, 8 个 GAs 含量在早薹植株中高于非早薹植株, 13 个 GAs 含量随植株发育时期延长逐渐增加。当归全长转录组中含有 9 个直接参与 GAs 代谢的酶基因, 可分为 6 个亚家族, 共含有 6 个保守基序, 亚细胞定位于细胞质。*GA2ox6* 和 *GA20ox1* 基因克隆片段由于插入序列与全长转录组测序片段存在长度差异。*GA2ox6* 基因在抽薹植株、随种苗春化作用和植株发育时期延长呈现低表达, 而在冷冻规避春化作用种苗中呈现高表达, *GA20ox1* 基因则相反; *GA2ox6* 和 *GA20ox1* 基因在叶和茎中相对于根均呈现高表达。结论 当归含有 9 个直接参与 GAs 代谢的酶基因, 各成员理化性质和结构存在一定的差异, *GA2ox6* 和 *GA20ox1* 基因表达水平与当归抽薹开花生理调控一致。

关键词: 当归; 赤霉素; 赤霉素代谢基因; 生物信息学; 基因克隆; 抽薹开花

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)01-0222-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.01.024

Analysis on gibberellins metabolic level, key enzyme genes clone and expression pattern during bolting and flowering plants in *Angelica sinensis*LIU Di¹, CUI Xiu-wen¹, HUANG Tian-miao¹, LI Mei-ling¹, LI Meng-fei¹, WEI Jian-he²

1. College of Life Science and Technology/Key Laboratory of Aridland Crop Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

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

Abstract: Objective To determine the contents of 16 gibberellins (GAs), screen the genes involved in GAs metabolism and analyze their bioinformatics, as well as clone the key genes and validate their expression level, so as to provide theoretical basis for regulating bolting and flowering of *Angelica sinensis*. **Methods** The GAs contents in different materials were determined by HPLC-MS/MS. The genes directly involved in GAs metabolism were screened based on the full-length transcriptomes of *A. sinensis*, the bioinformatics was analyzed using the online tools, and the expression levels of the *GA2ox6* and *GA20ox1* genes were validated by qRT-PCR. **Results** Among of the 16 GAs, the contents of eight GAs were higher in bolted plants than unbolted plants, and the contents of 13 GAs were increased with the extension of plant development. A total of nine genes directly involved in GAs metabolism were identified from *A. sinensis*, with six subfamily classified, six motifs included, and the sub-cellular located in the cytoplasm. There was a certain difference in the base sequences between the cloned fragment of *GA2ox6* and *GA20ox1* with the full-length transcriptomes, due to the inserted fragments in the sequence of *GA2ox6* and *GA20ox1*. The expression levels of *GA2ox6*

收稿日期: 2022-05-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32160083); 干旱生境作物学国家重点实验室 (甘肃农业大学) 基金项目 (GSCS-2021-Z03); 道地药材生态种植与质量保障项目 (202103003); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系 (CARS-21)**作者简介:** 刘 迪 (1997—), 女, 山西运城人, 硕士研究生, 主要从事当归抽薹开花调控方面研究。E-mail: liudi9728@163.com***通信作者:** 栗孟飞 (1980—), 男, 河南驻马店人, 博士, 教授, 主要从事药用植物学研究。E-mail: lmf@gsau.edu.cn

魏建和 (1970—), 男, 福建建阳人, 博士, 教授, 主要从事药用植物栽培、分子育种和次生代谢产物调控研究。

E-mail: jhwei@implad.ac.cn

渡期 (S2)、抽薹初期 (S3) 和抽薹伸长期 (S4)] 植株的叶片和侧根, 样品原植物均由甘肃农业大学栗孟飞教授鉴定为当归 *A. sinensis* (Oliv.) Diels, 植株生长环境及样品信息详见课题组前期实验^[18-19]。GA₁、GA₃、GA₄、GA₅、GA₆、GA₇、GA₈、GA₉、GA₁₄、GA₁₅、GA₁₉、GA₂₀、GA₂₄、GA₄₄、GA₅₁、GA₅₃ 对照品购自 Sigma 公司, 质量分数均大于 98%, 色谱甲醇购自 Tedia 公司。

1.2 仪器

Aglient 1290 型高效液相色谱仪, 美国 Aglient 公司; QTRAP 6500 型质谱仪, 美国 AB 公司; UYC-200 型全温培养摇床, 上海新苗医疗器械制造有限公司; 氮吹仪, 杭州米欧仪器有限公司; 台式高速离心机, 德国 SORVAL 公司; ABI QuantStudio 5 实时荧光定量 PCR 仪, 美国 ABI 公司; 超微量分光光度计, 上海宝予德科学仪器有限公司。

2 方法

2.1 GAs 含量的测定

2.1.1 赤霉素对照品溶液制备 分别称取 GA₁、GA₃、GA₄、GA₅、GA₆、GA₇、GA₈、GA₉、GA₁₄、GA₁₅、GA₁₉、GA₂₀、GA₂₄、GA₄₄、GA₅₁、GA₅₃ 对照品, 以甲醇为溶剂配制梯度为 0.1、0.2、0.5、2、5、20、50 和 200 ng/mL 标准溶液。每个质量浓度 2 次重复。

2.1.2 供试品溶液制备 称取新鲜样品 1.0 g, 研磨后加入 10 mL 乙腈溶液 4 ℃ 震荡 8 h, 4 ℃、13 000 r/min 离心 5 min 取上清, 沉淀再次加入 10 mL 乙腈溶液, 重复上述操作取上清, 合并 2 次上清液, 避光, 以氮气吹干有机相, 400 μL 甲醇溶解。4 ℃ 保存备用。

2.1.3 HPLC-MS/MS 条件 使用高效液相色谱仪 (Aglient 1290)-质谱仪 (QTRAP 6500, AB SCIEX)。(1) HPLC 条件: 色谱柱为 Poroshell 120 SB-C₁₈ 反相色谱柱 (150 mm×2.1 mm, 2.7 μm); 柱温 30 ℃; 进样量 2 μL; 流动相为甲醇/0.1%甲酸 (A)-水/0.1%甲酸 (B); 梯度洗脱 (0~1 min, 20%A; 1~9 min, 20%~80%A; 9~10 min, 80%A; 10~10.1 min, 80%~20%A, 10.1~15 min, 20%A); 体积流量 1 mL/min。(2) MS 条件: 采用电喷雾 (electron spray ionization, ESI) 离子源负离子电离模式, 扫描方式为多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式, 雾化器压力 447.85 kPa, 辅助气压力 482.30 kPa, 雾化温度 400 ℃, 气帘气 103.35 kPa, 毛细管电压 4500 V。

2.1.4 标准曲线的绘制及含量测定 将“2.1.1”和“2.1.2”项中标准溶液和供试样品溶液用 0.22 μm 滤膜滤过, 利用 HPLC-MS/MS 分别检测标准溶液和供试品溶液的峰面积。以色谱峰峰面积为纵坐标 (Y), GAs 质量浓度为横坐标 (X) 进行线性回归计算。根据 16 个 GAs 线性回归方程和相关系数, 表明对照品在 0.1~200 ng/mL 内线性良好 (表 1)。

表 1 16 个 GAs 的标准曲线

Table 1 Standard curves of 16 GAs

GAs	标准曲线	<i>r</i>
GA ₁	$Y=3\,549.488\,23\,X+133.1875\,5$	0.992\,30
GA ₃	$Y=10\,553.898\,86\,X+906.269\,83$	0.991\,71
GA ₄	$Y=2\,527.093\,42\,X+574.869\,54$	0.990\,50
GA ₅	$Y=3\,812.697\,02\,X+247.463\,13$	0.995\,86
GA ₆	$Y=6\,049.113\,26\,X-38.338\,84$	0.994\,10
GA ₇	$Y=4\,010.479\,46\,X+460.615\,56$	0.993\,98
GA ₈	$Y=4\,004.188\,48\,X+320.379\,62$	0.993\,38
GA ₉	$Y=9\,565.891\,09\,X+339.644\,59$	0.994\,87
GA ₁₄	$Y=1\,720.028\,91\,X+249.153\,79$	0.993\,89
GA ₁₅	$Y=3\,404.829\,57\,X+585.931\,67$	0.991\,07
GA ₁₉	$Y=2\,732.424\,09\,X+806.288\,35$	0.991\,09
GA ₂₀	$Y=12\,108.828\,63\,X+1112.843\,46$	0.992\,75
GA ₂₄	$Y=3\,291.635\,58\,X+492.300\,55$	0.992\,85
GA ₄₄	$Y=1\,129.842\,21\,X+171.731\,56$	0.992\,26
GA ₅₁	$Y=8\,468.885\,60\,X-191.062\,03$	0.994\,02
GA ₅₃	$Y=4\,528.009\,22\,X+474.965\,06$	0.992\,58

按照公式计算赤霉素含量 (W)。

$$W=C \times V/M$$

C 为 GAs 的质量浓度, V 为样品最终溶解时所用的溶液体积, M 为称取的样品质量

2.1.5 统计分析 每个实验重复 3 次, 运用 SPSS 软件 (T 检验) 进行数据差异显著性分析 ($P<0.05$); 使用 Origin 2021 软件进行数据绘图。

2.2 GAs 关键酶基因的生物信息学分析

2.2.1 基因序列来源 数据库来源于不同品种 (岷归 1 号和岷归 2 号) 全长转录组 (NCBI access: PRJNA782300)^[22]; 岷归 1 号种苗春化作用过程中 [T1 (0 ℃, 14 d; 未通过春化)、T2 (0 ℃, 60 d; 通过春化) 和 T3 (-3 ℃, 125 d; 低温规避春化)] 全长转录组 (NCBI access: PRJNA789039)^[17]。利用关键词 “gibberellins” 和 “GA” 直接检索, 初步筛选 GA 代谢相关基因, 去除重复; 然后利用 UniProt

数据库进行功能鉴定，去除非相关基因。

2.2.2 直接参与 GAs 代谢相关蛋白质序列鉴定及理化性质分析 蛋白质序列（包括氨基酸长度、相对分子质量和理论等电点）分析利用 ExPASy 在线工具；亚细胞定位利用 Cell-PLoc 在线工具；蛋白质二级结构预测利用 PRABI-Gerland 在线工具；蛋白质 3D 建模利用 Phyre 2 在线工具。

2.2.3 直接参与 GAs 代谢相关蛋白系统发育树构建 在 NCBI 数据库选择 10 个物种（拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.、黄胡萝卜 *Daucus carota subsp. Sativus* Hoffm.、蓝果树 *Nyssa sinensis* Oliv.、可可 *Theobroma cacao* L.、芝麻 *Sesamum indicum* L.、陆地棉 *Gossypium hirsutum* L.、茶树 *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze、葡萄 *Vitis vinifera* L.、烟草 *Nicotiana attenuate* L.、番茄 *Solanum lycopersicum* L.) 中置信度较高的 82 个蛋白,利用 MEGA11.0 软件邻接法(neighbor-Joining, NJ) 构建系统发育进化树(重复次数 1000 次,其他参数为默认值)。蛋白质保守基序分析利用 MEME 软件,并利用 TBtools 进行可视化。利用 DNAMAN 软件进行蛋白质多序列比对(深蓝色表示相似度 100%、粉色>75%、浅蓝色>50%)。

2.3 当归 GA2ox6 和 GA20ox1 基因克隆

以岷归 1 号温室栽培植株功能叶片为材料(T2 期,移栽生长 40 d)^[21]。总 RNA 提取利用 Plant RNA Kit R6827 试剂盒,其纯度和浓度检测使用超微量分光光度计;RNA 反转录使用 First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒得到 cDNA;利用 NCBI Primer-BLAST 设计引物(表 2)。扩增产物利用 1%TAE 琼脂糖凝胶电泳进行检测;胶回收使用琼脂糖凝胶纯化试剂盒 TIANGel Midi Purification Kit 试剂盒。基因克隆使用平末端克隆试剂盒 pHANDY

表 2 GA2ox6 和 GA20ox1 PCR 扩增和 qRT-PCR 验证的引物序列

Table 2 Primer sequences of GA2ox6 and GA20ox1 used for PCR amplification and qRT-PCR validation

基因	引物序列 (5'→3')	产物长度/bp	用途
GA2ox6	F: CATCAGACCCAAACCTC R: CGGGGTGATTCTAATTAAGGA	1023	PCR 扩增引物
GA20ox1	F: TAAACTATGGCAGCTTCTACATT R: GCTGCTCTGTGTGTGTTCA	1179	
Actin	F: TGGTATTGTGCTGGATTCTGGT R: TGAGATCACCACCAGCAAGG	109	qRT-PCR 验证引物
GA2ox6	qF: GCCTTGACTTGCTAAGGGTG qR: AGCCTCAGACCAAGAGAGTT	152	qRT-PCR 验证引物
GA20ox1	qF: AACCGTTCTACCAAGCGAAT qR: CCGGAGAGAAAGCCTCTATG	175	qRT-PCR 验证引物

®-Blunt Cloning Kit 试剂盒;引物合成及阳性克隆测序由兰州天启基因生物科技有限公司完成。

2.4 当归 GA2ox6 和 GA20ox1 基因表达分析

样品取自岷归 1 号两年生大田 EB 和 Un-EB 植株、三年生不同时期(S1~S4)植株、不同春化期(T1~T3)根茎顶端分生组织^[17-19]、以及不同器官(根、茎和叶)。利用 NCBI Primer-BLAST 设计 GA2ox6 和 GA20ox1 基因 qRT-PCR 表达引物(表 2),以 Actin 作为内参基因^[24]。RNA 提取及反转录参照利用 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) 进行 qRT-PCR 检测。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 GA2ox6 和 GA20ox1 基因的相对表达水平^[25]。

3 结果与分析

3.1 当归两年生 EB 和 Un-EB 植株中 GAs 含量的变化

通过对两年生 EB 和 Un-EB 植株中 16 个 GAs 进行 HPLC-MS/MS 测定(图 2),以及含量变化进行分析(图 3),结果显示,除 GA₁、GA₄、GA₇ 和

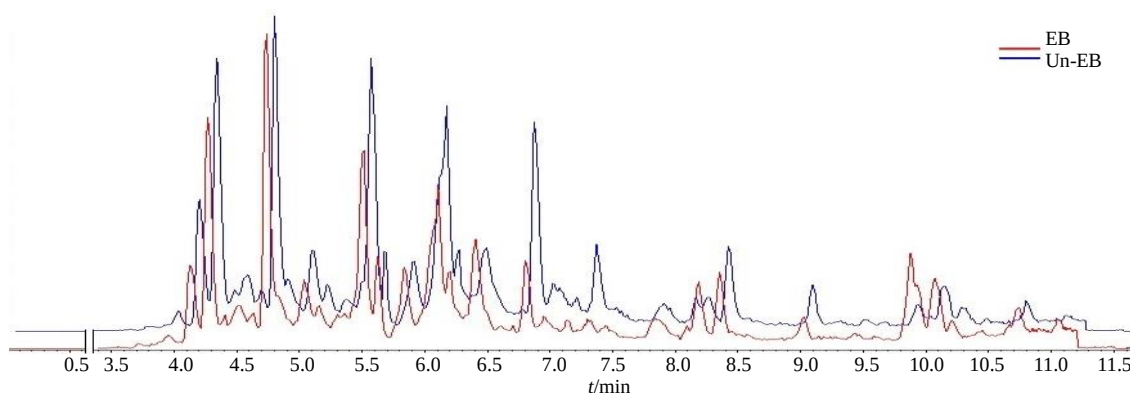
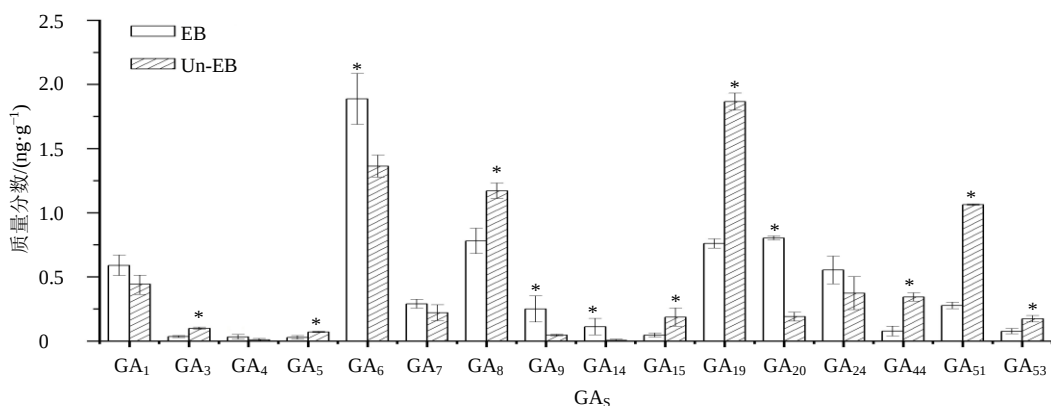


图 2 当归 EB 和 Un-EB 植株提取液 HPLC-MS/MS 色谱图

Fig. 2 HPLC-MS/MS chromatographic of extracts from EB and Un-EB plants of *A. sinensis*



*表示同一 GAs 在 EB 与 Un-EB 植株之间 $P < 0.05$ 水平下达到显著性差异

* indicates a significant difference at $P < 0.05$ level between the EB and Un-EB for the same GAs

图 3 当归 EB 和 Un-EB 植株中 16 个 GAs 含量的变化

Fig. 3 Changes of 16 GAs contents in EB and Un-EB plants of *A. sinensis*

GA₂₄ 外, 12 个 GAs 含量存在显著差异。EB 植株中 4 个 GAs (GA₆、GA₉、GA₁₄、GA₂₀) 含量显著高于 Un-EB 植株, 增加 1.32 (GA₇) ~ 22.4 (GA₁₄) 倍; 其他 8 个 GAs (GA₃、GA₅、GA₈、GA₁₅、GA₁₉、GA₄₄、GA₅₁ 和 GA₅₃) 含量显著降低, 降低 0.23 (GA₄₄) ~ 0.67 倍 (GA₈)。

3.2 当归三年生不同生长期植株中 GAs 含量的变化

通过对三年生不同生长期 (S1、S2、S3 和 S4) 植株中 16 个 GAs 进行 HPLC-MS/MS 测定 (图 4), 以及含量变化进行分析 (图 5), 结果显示, 16 个 GAs 含量也存在较大差异, 在 S1~S4 时期, GA₁₉ 含量最高 (9.34 ng/g), 依次为 GA₆ (3.78 ng/g) 和 GA₂₄ (3.45 ng/g)。S4 相对于 S1, 14 个 GAs (GA₁、GA₃、GA₄、GA₅、GA₆、GA₈、GA₉、GA₁₅、GA₁₉、GA₂₀、GA₂₄、GA₄₄、GA₅₁ 和 GA₅₃) 增加 1.35 (GA₄) ~

7.18 (GA₉) 倍, 而 GA₁₄ 和 GA₇ 分别下降 0.36 和 0.96 倍。除 GA₃、GA₇ 和 GA₁₄ 外, 13 个 GAs 含量随生长时间的延长呈现逐渐增加且在 S4 时期达到最大, 而 GA₃、GA₇ 和 GA₁₄ 分别在 S2、S3 和 S2 时期达到最大 (图 5)。

3.3 参与当归 GAs 代谢的关键酶基因生物信息学

3.3.1 当归 GAs 代谢相关基因鉴定及理化性质 通过对当归不同品种叶片和叶柄、种苗春化作用过程中根茎顶端分生组织的全长转录组进行筛选, 发现有 9 个基因直接参与和 18 个基因间接参与 GAs 代谢 (表 3)。进一步对直接参与 GAs 代谢基因所编码的蛋白质序列和亚细胞定位分析, 结果显示, 9 个蛋白质序列长度为 189 (GA2ox1-2) ~ 552 (GA2ox8)、相对分子质量为 21 550 ~ 63 400、等电点为 5.47 (GA3ox2) ~ 8.68 (GA2ox8), 亚细胞均定位于细胞质 (表 4)。

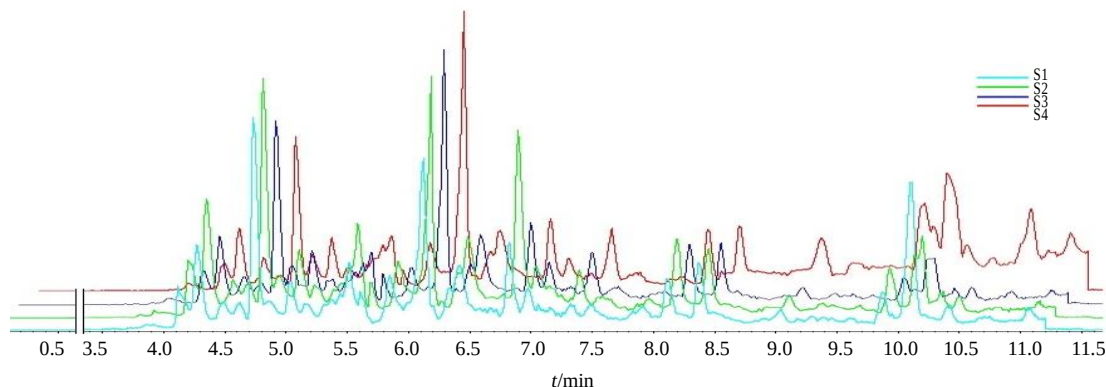
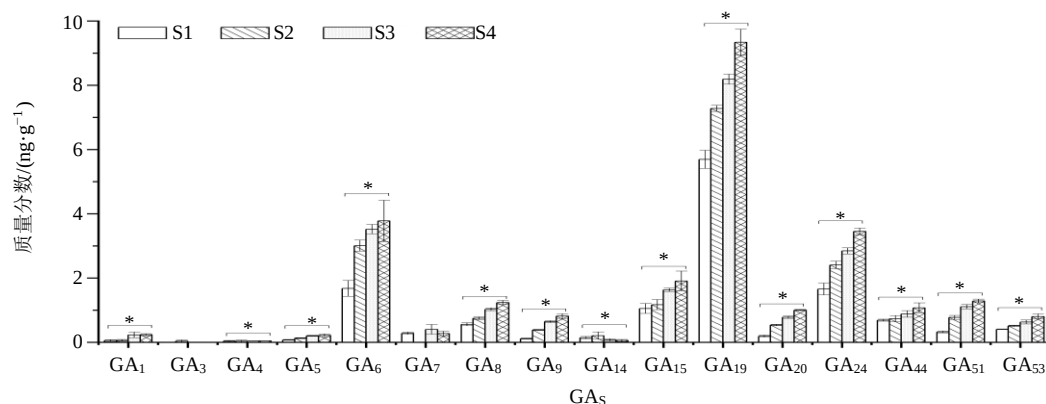


图 4 当归三年生不同生长期植株提取液 HPLC-MS/MS 色谱图

Fig. 4 HPLC-MS/MS chromatographic of extracts from 3-year-pld plants of *A. sinensis* at different growth stages



*表示同一 GAs 在 S1 和 S4 之间 $P < 0.05$ 水平下达到显著性差异

*indicates a significant difference at $P < 0.05$ level between S1 and S4 for the same GAs

图 5 当归三年生不同生长期 16 个 GAs 含量的变化

Fig. 5 Changes of the 16 GAs content in 3-year-old plants of *A. sinensis* at different growth stages

表 3 当归全长转录组中直接和间接参与 GAs 代谢的基因

Table 3 Genes directly and indirectly involved in GAs metabolism from transcriptomes in *A. sinensis*

基因	蛋白质	参与方式
GA2ox1-1	gibberellin 2-beta-dioxygenase 1	直接
GA2ox1-2	gibberellin 2-beta-dioxygenase	直接
GA2ox6	gibberellin 2-beta-dioxygenase 6	直接
GA2ox7	gibberellin 2-beta-dioxygenase 7	直接
GA2ox8	gibberellin 2-beta-dioxygenase 8	直接
GA3ox2	gibberellin 3-beta-dioxygenase 2	直接
GA20ox1	gibberellin 20 oxidase 1	直接
GA20ox2	gibberellin 20 oxidase 2	直接
GA20ox3	gibberellin 20 oxidase 3	直接
CIGR1	chitin inducible gibberellin responsive protein 1	间接
CIGR2	chitin-inducible gibberellin responsive protein 2	间接
CPS	ent-copalyl diphosphate synthase	间接
GAI-1	DELLA protein GAI	间接
GAI-2	DELLA protein GAI	间接
GASA1	gibberellin-regulated protein 1	间接
GASA2	gibberellin-regulated protein 2	间接
GASA6	gibberellin-regulated protein 6	间接
GASA7	gibberellin-regulated protein 7	间接
GASA14	gibberellin-regulated protein 14	间接
GID1	gibberellin receptor GID1	间接
GID1A	gibberellin receptor GID1A	间接
GID1B-1	gibberellin receptor GID1B-1	间接
GID1B-2	gibberellin receptor GID1B-2	间接
GID1C	gibberellin receptor GID1C	间接
KO	ent-kaurene oxidase	间接
KAO1	ent-kaurenoic acid oxidase 1	间接
TPS4	ent-kaurene synthase TPS4	间接

表 4 直接参与当归 GAs 代谢蛋白质的特征及亚细胞定位

Table 4 Characteristic and subcellular location of proteins directly involved in GAs metabolism in <i>A. sinensis</i>						
基因	蛋白质	CDS 长度/bp	蛋白质大小/aa	相对分子质量	等电点	亚细胞定位
<i>GA2ox1-1</i>	gibberellin 2-beta-dioxygenase 1	1013	338	38 335.40	6.23	细胞质
<i>GA2ox1-2</i>	gibberellin 2-beta-dioxygenase	567	189	21 552.62	6.84	细胞质
<i>GA2ox6</i>	gibberellin 2-beta-dioxygenase 6	1023	340	38 610.20	6.21	细胞质
<i>GA2ox7</i>	gibberellin 2-beta-dioxygenase 7	1008	335	37 564.61	5.82	细胞质
<i>GA2ox8</i>	gibberellin 2-beta-dioxygenase 8	1707	552	63 401.49	8.68	细胞质
<i>GA3ox2</i>	gibberellin 3-beta-dioxygenase 2	987	329	36 436.81	5.47	细胞质
<i>GA20ox1</i>	gibberellin 20 oxidase 1	1179	392	44 453.60	6.80	细胞质
<i>GA20ox2</i>	gibberellin 20 oxidase 2	1029	343	39 493.80	5.97	细胞质
<i>GA20ox3</i>	gibberellin 20 oxidase 3	1104	368	42 041.43	6.23	细胞质

3.3.2 直接参与当归 GAs 代谢蛋白质的结构分析
通过对 9 个直接参与 GAs 代谢基因所编码的蛋白质进行二级结构预测以及 3D 建模, 结果显示, 蛋白质二级结构由 α 螺旋、延伸链、 β 转角和无规则卷曲组成(表 5), 无规则卷曲是构成二级结构的主要组成部分, 占比 30.25% (*GA2ox8*) ~ 45.56% (*GA2ox1-1*), 其次是 α 螺旋和延伸链, 分别占比 27.76% (*GA2ox7*) ~ 41.12% (*GA2ox8*) 和 15.20% (*GA3ox2*) ~ 22.22% (*GA2ox1-2*); 有些蛋白质三级结构较为相似(如 *GA20ox1* 和 *GA20ox3*), 但有些空间结构差异较大(如 *GA2ox1-2*、*GA2ox6* 和 *GA20ox1* 等)(图 6)。

表 5 直接参与当归 GAs 代谢 9 个蛋白质的二级结构

Table 5 Secondary structure of nine proteins directly involved in GAs metabolism in <i>A. sinensis</i>								
蛋白质	α 螺旋	占比/%	延伸链	占比/%	β 折叠	占比/%	无规则卷曲	占比/%
<i>GA2ox1-1</i>	95	28.11	64	18.90	25	7.48	154	45.56
<i>GA2ox1-2</i>	66	34.92	42	22.22	16	8.47	65	34.93
<i>GA2ox6</i>	158	33.76	90	19.23	26	5.56	194	41.45
<i>GA2ox7</i>	93	27.76	66	19.70	16	4.78	160	47.76
<i>GA2ox8</i>	227	41.12	120	21.74	38	6.88	167	30.25
<i>GA3ox2</i>	122	37.08	50	15.20	8	2.43	149	45.29
<i>GA20ox1</i>	128	32.65	74	18.88	22	5.61	168	42.86
<i>GA20ox2</i>	107	31.20	67	19.53	24	7.00	145	42.27
<i>GA20ox3</i>	128	34.78	64	17.39	18	4.89	158	42.93

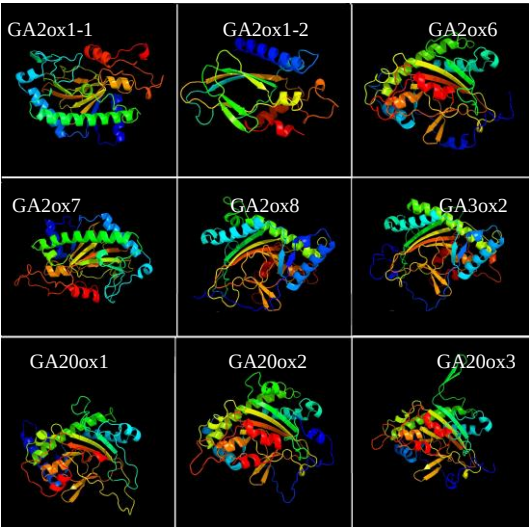


图 6 直接参与当归 GAs 代谢 9 个蛋白质的三级结构

Fig. 6 Tertiary structure of nine proteins directly involved in GAs metabolism in *A. sinensis*

3.3.3 直接参与当归 GAs 代谢蛋白质的进化树构建 通过对 9 个直接参与当归 GAs 代谢蛋白质、以及模式植物拟南芥等 10 个物种的 82 个 GAs 代谢蛋白质进行系统进化树构建,基于蛋白质序列相似性,这 91 个蛋白质被分成 6 个亚族 Group I~VI, 其中 GA2ox6 和 GA20ox1 分别位于 GroupI 和 GroupIII 亚族 (图 7)。

3.3.4 直接参与当归 GAs 代谢的蛋白质基序通

过对以上 91 个蛋白质进行结构域和基序分析,结果发现,这 91 个蛋白质分为 6 个亚族,与系统进化树关系一致 (图 7), 序列含有 6 个保守基序 (表 6); 直接参与当归 GAs 代谢的同一亚家族蛋白质基序具有高度相似性, 其中, GA2ox6 亚族均含有 Motif 1~Motif 4 和 Motif 6; GA20ox1 亚族均含有 Motif 1~Motif 6; 而不同亚族蛋白质基序存在较大差异, 比如, Motif 5 只存在于 Group III 亚族 (图 8)。

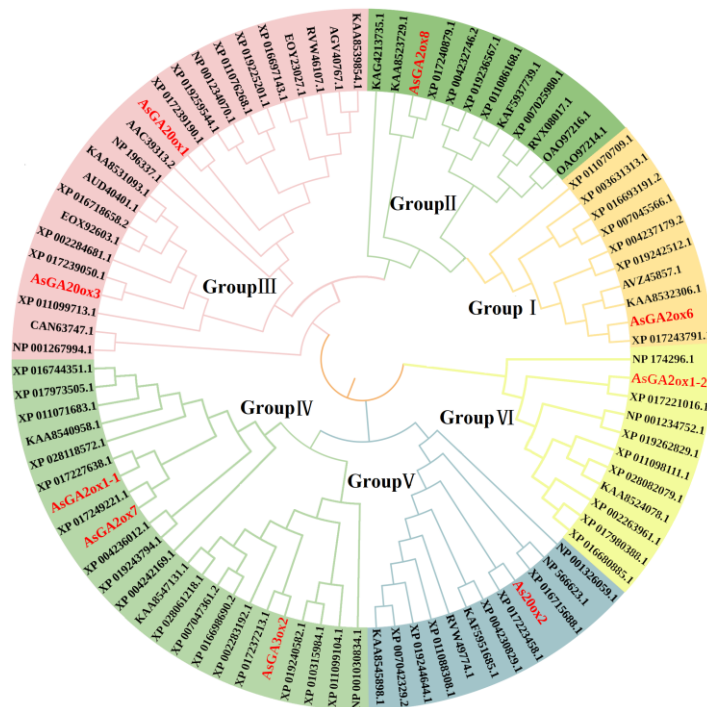


图 7 当归和拟南芥等 11 个物种 GAs 代谢蛋白质的系统进化树

Fig. 7 Phylogenetic tree of proteins involved in GAs metabolism in 11 species such as *A. sinensis* and *A. thaliana*

表 6 直接参与 GAs 代谢蛋白质 6 个保守基序及其序列

Table 6 Six motifs and their conserved sequences of GAs metabolism proteins directly participated

基序	长度/aa	保守基序
Motif 1	50	WISVKPNPDAFVVNIGDLFQALSNGRYKSVEHRVVVNSKKERFSIAFFLC
Motif 2	21	GLGPHTDPGFLTLHQDDVGG
Motif 3	21	RQIGKACREWGFFQVVNHGVP
Motif 4	18	ESTSFLRLNYYPPCPIPD
Motif 5	50	AHRYMDAFFKLPLSEKQRAQRKLGEHCGYASSFTGRFSSKLPWKETLSFR
Motif 6	19	LSLKJMEJJALSGLPPDH

3.3.5 当归 GA2ox6 和 GA20ox1 蛋白质多序列比对 通过将当归 AsGA2ox6 和 AsGA20ox1 与 NCBI 中拟南芥和黄胡萝卜等物种中同源性较高的 5 个蛋白质进行多序列比对,结果显示,GA2ox6 与同科黄胡萝卜同源性最高,相似性达到 89.74% (XP_017243791.1),依次为蓝果树 71.55%

(KAA8532306.1)、茶树 68.84% (AVZ45857.1)、烟草 66.57% (XP_019242512.1) 和番茄 65.98% (XP_004237179.2) (图 9-A); GA20ox1 也与黄胡萝卜同源性最高,达到 82.95% (XP_017239190.1),依次为番茄 69.13% (NP_001234070.1)、芝麻 67.94% (XP_011076268.1)、蓝果树 67.09% (KAA8539854.1)

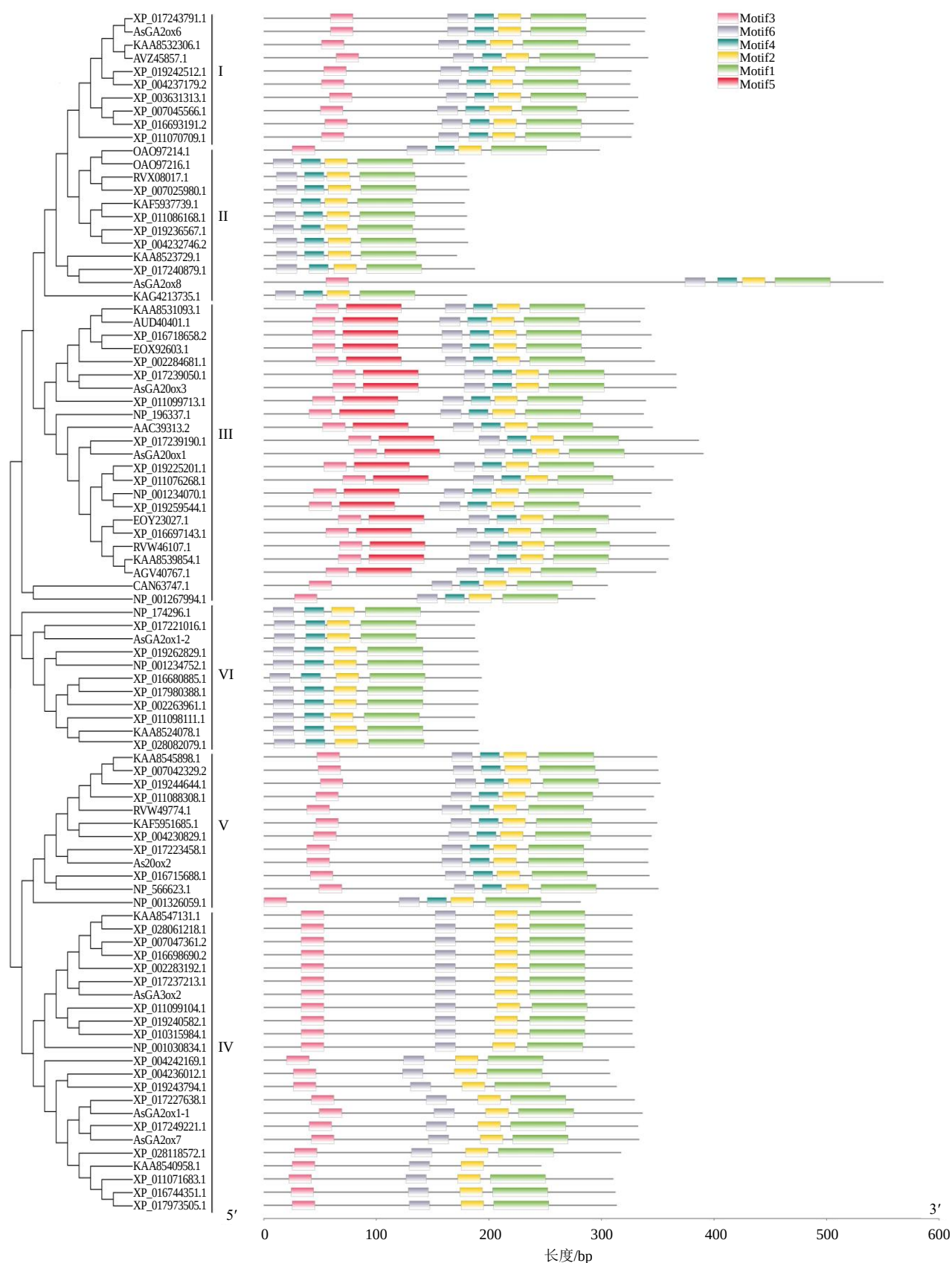


图 8 当归和拟南芥等 11 个物种 GAs 代谢蛋白质的保守基序

Fig. 8 Conserved sequences of proteins involved in GAs metabolism in eleven species such as *A. sinensis* and *A. thaliana*

和烟草 66.33% (XP_019225201.1) (图 9-B)。

3.4 当归 GA2ox6 和 GA2ox1 基因克隆

为了保证全长转录组中当归 GA2ox6 和 GA2ox1 基因碱基序列的准确性, 基于全长转录组中 GA2ox6 和 GA2ox1 基因碱基序列设计扩增引物, 以岷归 1 号功能叶片中 RNA 反转录所得的 cDNA 为模板, 进行 GA2ox6 和 GA2ox1 基因克隆。琼脂糖凝胶电泳显示, GA2ox6 和 GA2ox1

基因扩增片段大小为 1000~2000 bp (图 10); 产物回收与碱基测序显示, GA2ox6 基因克隆长度为 1477 bp (458 bp 和 777 bp 处插入了 95 bp 和 370 bp); GA2ox1 基因克隆长度为 1455 bp (558 bp 和 880 bp 处插入了 108 bp 和 199 bp); 通过与全长转录组测序获得的 GA2ox6 和 GA2ox1 进行序列比对, 除了插入 2 个片段外, 其他相似度为 100% (图 11)。

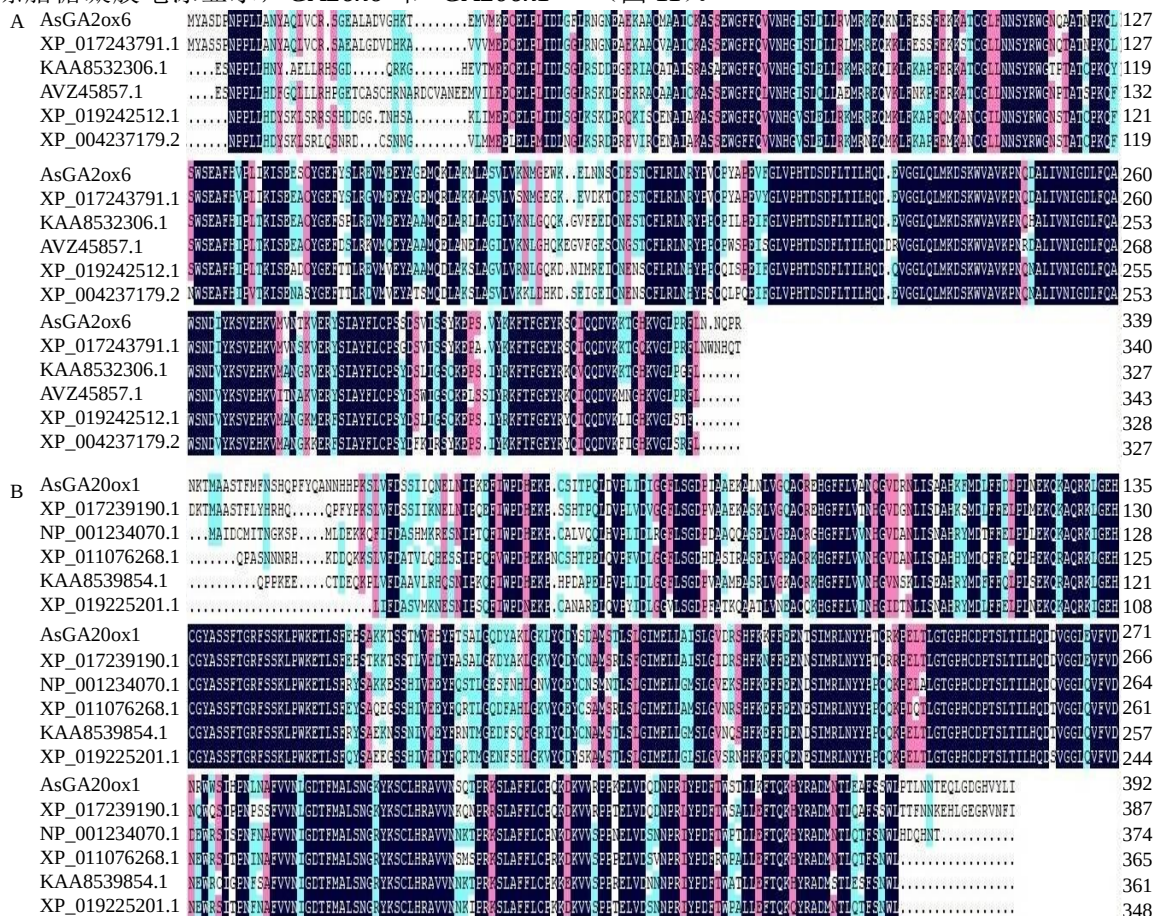


图 9 当归 GA2ox6 (A) 和 GA2ox1 (B) 蛋白质与 5 个其他物种蛋白质的多序列比对

Fig. 9 Multiple sequence alignment of GA2ox6 (A) and GA2ox1 (B) in *A. sinensis* compared with five other species

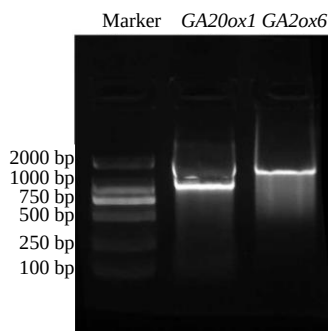


图 10 当归 GA2ox6 和 GA2ox1 基因扩增产物

Fig. 10 Agarose gel electrophoresis of amplification products of GA2ox6 and GA2ox1 genes in *A. sinensis*

3.5 当归 GA2ox6 和 GA2ox1 基因表达分析

为了进一步验证 GA2ox6 和 GA2ox1 基因的生物化学功能, 对当归不同材料中 GA2ox6 和 GA2ox1 基因的表达水平进行了 qRT-PCR 检测与分析, 结果 (图 12) 显示, EB 相对于 Un-EB, GA2ox6 呈现低表达, 而 GA2ox1 呈现高表达; 不同生长期植株中, GA2ox6 表达水平随着时间延长呈现逐渐降低, 而 GA2ox1 呈现逐渐增加; 不同春化期种苗根茎顶端分生组织中, T2 相对 T1, GA2ox6 表达水平降低, 而 T3 相对 T1 表达增加, 而 GA2ox1 则相反; 不同器官中, GA2ox6 和 GA2ox1

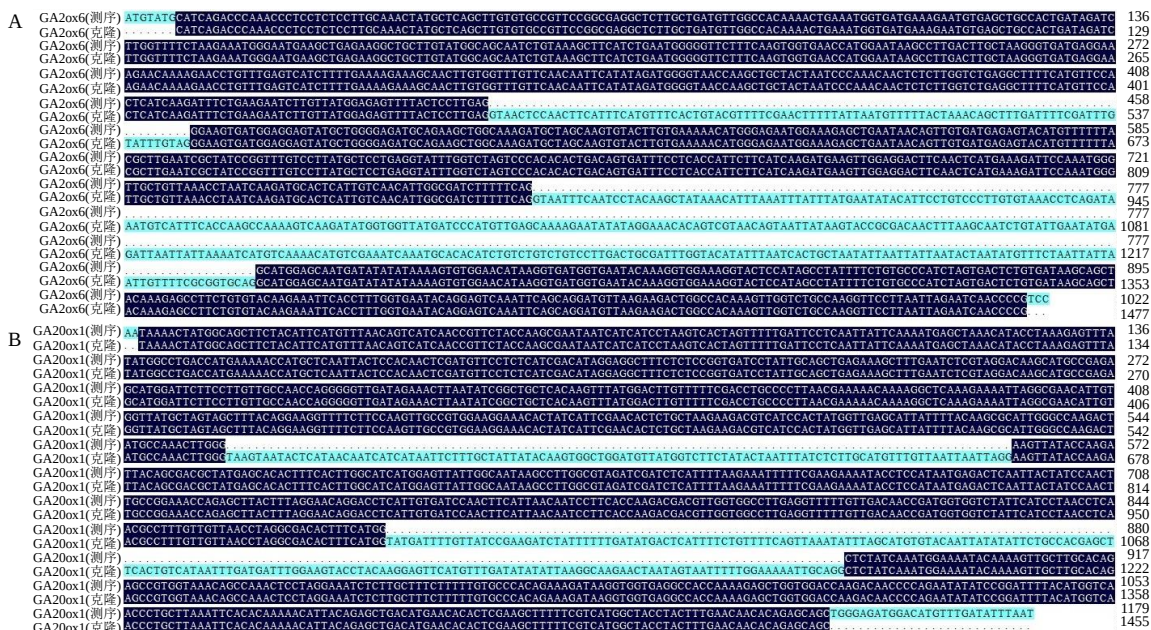


图 11 当归 GA2ox6 (A) 和 GA20ox1 (B) 基因克隆与全长转录组测序的序列比对

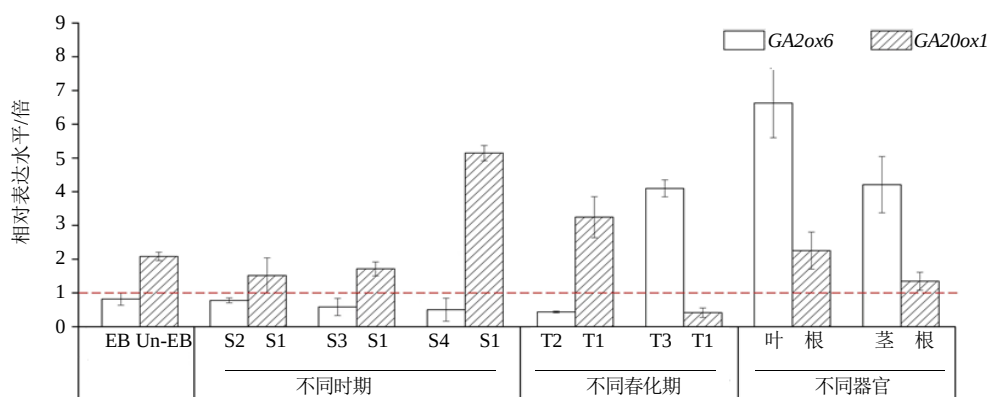
Fig. 11 Sequence alignment of GA2ox6 (A) and GA20ox1 (B) genes obtained from gene clone and full-length sequencing in *A. sinensis*

图 12 当归 GA2ox6 和 GA20ox1 基因在不同材料中的相对表达水平

Fig. 12 Relative expression levels of GA2ox6 and GA20ox1 genes in different materials of *A. sinensis*

在茎和叶相对于根均呈现高表达。

4 讨论

目前, EB 开花导致根木质化不能入药仍是困扰当归生产、质量和效益提升的重大难题^[4]。大量研究表明, GA 调控植物生长发育过程——种子萌发、茎的伸长、花的发育、果实的形成和种子的发育, 其含量的变化受到特定环境因素和生物合成酶基因的影响^[7]。本研究发现, 16 个 GAs 含量在当归 EB 相对于 Un-EB 植株、不同生长发育时期植株中存在显著差异; 基于当归全长转录组, 发现 9 个基因直接参与 GAs 代谢; 另外, 克隆获得的关键酶基因 GA2ox6 和 GA20ox1 表达水平与相应的 GAs 代谢

水平一致。

大量研究表明, GA 最显著的作用是通过促进细胞伸长和分裂进而诱发植物茎的伸长^[7]。前期研究发现, 外源喷施 GA₃ 可显著促进当归提前抽薹开花^[15]; 在抽薹分化前期植株中含量较高^[16]; 在种苗春化作用过程中显著升高, 而冷冻回避春化作用显著降低^[17]。本研究发现, GA₃ 含量在 EB 植株低于 Un-EB 植株, 生长发育过程中 S1~S4 时期呈“上升-下降-上升”趋势, 这与前人的研究结果存在一定差异。可能原因是: S1~S2 时期植株处于生长旺盛阶段, 植株营养物质积累有利于 GA₃ 的生物合成, 进而诱发抽薹, 当植株开始抽薹, 较多的 GA₃ 转运

至茎,促进花器官形成和果实发育^[26]。另外,研究证实在菠菜中喷施赤霉素抑制剂 BX-112,导致了 GA₁ 和 GA₈ 水平降低从而积累了 GA₂₀,抑制菠菜茎的伸长。这与本研究结果一致,在当归发育过程中 GA₁、GA₄ 和 GA₂₀ 逐渐升高。较高的 GA₁ 通过促进细胞分裂来增加顶端分生组织的生命活力使节间数增多,同时促进微管组织和叶片发育,从而加速植物生长速率促进抽薹^[27]。然而,GA₄ 在调控抽薹开花过程中,集中在花器官中,调控雄蕊的发育等,因此叶片和侧根 GA₄ 含量可能低于其它 GAs^[9]。此外,活性 GAs (如 GA₁、GA₄、GA₆ 和 GA₇) 在 EB 植株中显著高于 Un-EB 植株,而非活性 GAs 相反;在不同生长期 16 个 GAs 中,除 GA₃、GA₇ 和 GA₁₄ 外,13 个 GAs 随生长发育时间延长含量逐渐增加。

为了进一步了解 GAs 参与当归抽薹开花的机制,本研究对 9 个直接参与 GAs 代谢基因进行了生物信息学分析和关键基因克隆及表达验证。研究发现,拟南芥含有 16 个 GA 氧化酶基因 (AtGA20ox1-8、AtGA20ox1-5 和 AtGA3ox1-3)^[28];苹果含有 41 个 GA 氧化酶基因 (MdGA20ox1-20, MdGA3ox1-14 和 MdGA20ox1-7)^[29];葡萄含有 24 个 GA 氧化酶基因 (VvGA20ox1-11、VvGA3ox1-6 和 VvGA20ox1-7)^[30]。本研究基于当归全长转录组,发现有 9 个 GA 氧化酶基因 (GA20ox1-1、GA20ox1-2、GA20ox6-8、GA3ox2 和 GA20ox1-3)。本课题组获得的 9 个 GA 氧化酶与拟南芥、苹果和葡萄等^[28-30]氧化酶二级结构基本一致;苹果、葡萄和黄瓜等^[29-31]其他物种亚细胞定位于细胞核或细胞质,本研究中的有 9 个 GA 氧化酶均定位于细胞质。

通过对拟南芥、苹果和葡萄等^[28-30]物种研究发现,GA20ox、GA3ox 和 GA20ox 基因家族根据结构的差异分布在不同的亚族中,表明植物 GA 氧化酶基因进化关系相近的保守结构相似,同一亚族在进化上具有一定的保守性,且进化关系越近的亚族,其保守基序的同源性越高。本研究基于系统发育树发现,GA20ox1 和 GA20ox3 位于 GroupIII 亚族,而 GA20ox1-1、GA20ox7 和 GA3ox2 位于 GroupIV 亚族,其中,GA20ox1 和 GA20ox3 含有相同的保守基序 (Motif 1~6),而 GA20ox1-1、GA20ox7 和 GA3ox2 含有相同的保守基序 (Motif 1~3, Motif 6)。同时,本研究中当归 GA20ox6 和 GA20ox1 蛋白质序列与同科植物胡萝卜的相似度最高,亲缘关系最近。另外,基因克隆获得的 GA20ox6 和 GA20ox1 序列与转录组

结果存在一定差异,表明本研究所获得的序列可能尚不完整。

在当归 EB 相对 Un-EB 植株研究中发现,GA3ox 基因表达量较高,而 GA20ox 基因表达量没有显著变化^[21];本研究发现,GA20ox6 基因在 EB 植株中低表达,这与 GA₈ 在 EB 植株中含量低于 Un-EB 植株的结果一致;GA20ox1 基因在 EB 植株中高表达,这与 GA₁、GA₄、GA₉ 和 GA₂₀ 在 EB 植株中含量低于高于 Un-EB 植株的结果一致。在植物不同器官研究中发现,甘蓝型油菜中 GA20ox6 基因主要在根和叶中表达^[32],拟南芥中 GA20ox6 基因在叶中表达量显著高于根^[33],枳橙中 GA20ox1 主要在节间、叶片和种子中表达^[34],黄瓜中 GA20ox1 基因在叶中表达量显著高于根和茎^[31],这与本研究中当归 GA20ox6 和 GA20ox1 基因表达量在叶>茎>根的结果一致。同时,在本研究不同生长期发现,GA20ox6 基因表达量随植株生长发育时期延长和在种苗春化作用中显著降低,在冷冻回避春化作用种苗中显著升高,而 GA20ox1 基因表达量相反。大量研究表明,GA20ox6 通过催化 GA₂₀、GA₄ 和 GA₁ 分别形成非活性的 GA₂₉、GA₃₄ 和 GA₈ 调节植株抽薹开花^[32];因此,本研究不同材料中参与 GAs 酶基因表达量的变化,会直接引起相应 GAs 含量水平的变化,最终呈现出抽薹开花的生理差异。

综合以上研究表明,本实验首次对当归抽薹开花过程中 16 个 GAs 含量进行了测定、对筛选的 9 个直接参与 GAs 代谢的酶基因进行了生物信息学分析、并对关键酶基因 (GA20ox6 和 GA20ox1) 进行了克隆及表达验证。但对关键酶基因 (GA20ox6 和 GA20ox1) 片段的完整性、以及其它 GAs 生物合成相关基因 (如 KO、GA20ox8 和 GA3ox2) 的生物学特性等还需要进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 139.
- [2] Wei W L, Zeng R, Gu C M, et al. *Angelica sinensis* in China-A review of botanical profile, ethnopharmacology, phytochemistry and chemical analysis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 190: 116-141.
- [3] 晋玲. 当归生产加工适宜技术 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2018: 236.
- [4] 栗孟飞, 康天兰, 晋玲, 等. 当归抽薹开花及其调控途径研究进展 [J]. *中草药*, 2020, 51(22): 5894-5899.

- [5] Zhang H Y, Bi W G, Yu Y, *et al.* *Angelica sinensis* (oliv.) Diels in China: Distribution, cultivation, utilization and variation [J]. *Genet Resour Crop Evol*, 2012, 59(4): 607-613.
- [6] Li M L, Cui X W, Jin L, *et al.* Bolting reduces ferulic acid and flavonoid biosynthesis and induces root lignification in *Angelica sinensis* [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2022, 170: 171-179.
- [7] Lincoln Taiz, Eduardo Zeiger. 植物生理学 [M]. 北京: 科学出版社, 2015: 569-596.
- [8] Wilson R N, Heckman J W, Somerville C R. Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days [J]. *Plant Physiol*, 1992, 100(1): 403-408.
- [9] Eriksson S, Böhlenius H, Moritz T, *et al.* GA4 is the active gibberellin in the regulation of LEAFY transcription and *Arabidopsis* floral initiation [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(9): 2172-2181.
- [10] King R W, Evans L T. Gibberellins and flowering of grasses and cereals: Prizing open the lid of the “florigen” black box [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2003, 54: 307-328.
- [11] Ait-Ali T, Frances S, Weller J L, *et al.* Regulation of gibberellin 20-oxidase and gibberellin 3 β -hydroxylase transcript accumulation during De-etiolation of pea seedlings [J]. *Plant Physiol*, 1999, 121(3): 783-791.
- [12] Fleet C M, Yamaguchi S, Hanada A, *et al.* Overexpression of AtCPS and AtKS in *Arabidopsis* confers increased ent-kaurene production but no increase in bioactive gibberellins [J]. *Plant Physiol*, 2003, 132(2): 830-839.
- [13] Yan J D, Liao X Y, He R Q, *et al.* Ectopic expression of GA 2-oxidase 6 from rapeseed (*Brassica napus* L.) causes dwarfism, late flowering and enhanced chlorophyll accumulation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2017, 111: 10-19.
- [14] 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.
- [15] 张珍芳. 当归早期抽薹相关激素及其它生理生化指标分析 [D]. 兰州: 兰州大学, 2011.
- [16] 黄珊. 当归早期抽薹分化和内源性激素变化研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2020.
- [17] Luo M M, Liu X X, Su H Y, *et al.* Regulatory networks of flowering genes in *Angelica sinensis* during vernalization [J]. *Plants (Basel)*, 2022, 11(10): 1355.
- [18] Li M F, Li J, Wei J H, *et al.* Transcriptional controls for early bolting and flowering in *Angelica sinensis* [J]. *Plants (Basel)*, 2021, 10(9): 1931.
- [19] Li J, Li M L, Zhu T T, *et al.* Integrated transcriptomics and metabolites at different growth stages reveals the regulation mechanism of bolting and flowering of *Angelica sinensis* [J]. *Plant Biol (Stuttg)*, 2021, 23(4): 574-582.
- [20] Gao X, Guo F X, Chen Y, *et al.* Full-length transcriptome analysis provides new insights into the early bolting occurrence in medicinal *Angelica sinensis* [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 13000.
- [21] Yu G, Zhou Y, Yu J J, *et al.* Transcriptome and digital gene expression analysis unravels the novel mechanism of early flowering in *Angelica sinensis* [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 10035.
- [22] Zhu T T, Zhang M H, Su H Y, *et al.* Integrated metabolomic and transcriptomic analysis reveals differential mechanism of flavonoid biosynthesis in two cultivars of *Angelica sinensis* [J]. *Molecules*, 2022, 27(1): 306.
- [23] Liu X X, Luo M M, Li M F, *et al.* Depicting precise temperature and duration of vernalization and inhibiting early bolting and flowering of *Angelica sinensis* by freezing storage [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 853444.
- [24] Xu R, Xu J, Li Y C, *et al.* Integrated chemical and transcriptomic analyses unveils synthetic characteristics of different medicinal root parts of *Angelica sinensis* [J]. *Chin Herb Med*, 2020, 12(1): 19-28.
- [25] Willems E, Leyns L, Vandesompele J. Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates [J]. *Anal Biochem*, 2008, 379(1): 127-129.
- [26] 周琴, 张思思, 包满珠, 等. 高等植物成花诱导的分子机理研究进展 [J]. 分子植物育种, 2018, 16(11): 3681-3692.
- [27] Zeevaart J A, Gage D A, Talon M. Gibberellin A1 is required for stem elongation in spinach [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(15): 7401-7405.
- [28] 石永春, 邓晓旭, 刘卫群. 拟南芥 GA20 氧化酶家族的生物信息学分析 [J]. 河南农业大学学报, 2010, 44(4): 453-455, 461.
- [29] 董凤, 樊胜, 马小龙, 等. 苹果赤霉素氧化酶基因 GA2ox、GA3ox 和 GA20ox 家族全基因组鉴定及表达分析 [J]. 园艺学报, 2018, 45(4): 613-626.
- [30] He H H, Liang G P, Lu S X, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of GA2ox, GA3ox, and GA20ox are related to gibberellin oxidase genes in grape (*Vitis Vinifera* L.) [J]. *Genes*, 2019, 10(9): 680.
- [31] 庞保亚, 李强, 任仲海. 黄瓜 CsGA20ox1 异源表达促进拟南芥植株发育 [J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2018, 49(4): 578-584.
- [32] 廖晓英. 甘蓝型油菜中 GA2ox 家族基因克隆及 BnGA2ox6 功能研究 [D]. 长沙: 湖南大学, 2015.
- [33] 段秋红, 赵小英, 贺热情, 等. 拟南芥 GA2ox 基因家族启动子分析 [J]. 生物信息学, 2013, 11(4): 275-281.
- [34] 袁飞荣, 李芳, 蒋巧巧, 等. 转基因枳橙中 GA20ox1 与 rol 基因互作关系的研究 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(19): 214-221.

[责任编辑 时圣明]