

西洋参 cDNA 文库构建及表达序列标签 (EST) 分析

陈士林¹, 孙永巧², 宋经元^{1*}, 李 滢¹, 李晨吉²,
胡松年², 李西文¹, 姚 辉¹, 张晓伟^{2*}

(1. 中国医学科学院 药用植物研究所, 北京 100094; 2. 中国科学院 北京基因组研究所, 北京 100029)

摘要: 为研究西洋参根的基因表达谱和挖掘其功能基因, 采用表达序列标签 (EST) 技术首次建立了四年生西洋参根的 EST 文库。通过 BLAST 与 Gene Ontology 分析获得与人参皂苷生物合成相关、编码 P450 和糖基转移酶等的基因序列 11 个, 与生长素调节生长发育相关、编码生长素响应因子 4 和生长素调节蛋白等的基因 6 个, 与水胁迫相关、编码蛋白 dehydrin 和 DC2.15 like 蛋白等的基因 7 个, 与编码抗氧化酶如 peroxidase 和 catalase 相关的基因 6 个。另外, 从西洋参根的 EST 文库获得抗病基因 12 个, 分别编码转录因子 WRKY 家族蛋白和 ribonuclease 蛋白家族, 62 个 EST 是其他物种尚未报道的新基因。可见, EST 技术作为功能基因组研究的重要手段可在西洋参功能基因的开发与研究发挥重要作用, 这些基因的发现为进一步克隆基因全长、研究基因功能、改良西洋参品质、阐明西洋参生长缓慢的分子机制等方面奠定了基础。

关键词: 表达序列标签; 功能基因; 西洋参

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2008)06-0657-07

Analysis of expressed sequence tags (EST) from *Panax quinquefolium* root

CHEN Shi-lin¹, SUN Yong-qiao², SONG Jing-yuan^{1*}, LI Ying¹, LI Chen-ji²,
HU Song-nian², LI Xi-wen¹, YAO Hui¹, ZHANG Xiao-wei^{2*}

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100094, China;

2. Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100029, China)

Abstract: To investigate the profile of gene expression in American ginseng (*Panax quinquefolium* L.) and discover its functional genes, for the first time, expressed sequence tags (EST) library of four-year-old American ginseng roots has been established. According to BLAST and Gene Ontology analysis, eleven genes, encoding cytochrome P450, glucosyltransferase, farnesyltransferase and cyclase family protein, are found to be associated with ginsenosides biosynthesis. Six other genes are obtained encoding auxin-regulated protein, auxin response factor 4 and auxin-repressed protein in the roots of American ginseng. In addition, thirteen expressed transcripts are stress-connected proteins and twelve expressed other transcripts are closely related to plant defense in four-year-old American ginseng roots. Furthermore, 62 genes no hit in BLAST and in Interproscan may be new genes. These results indicate EST is an useful tool for research on functional genomics of *P. quinquefolium* and it can be applied to the molecular modification of the ginsenosides biosynthetic pathway ultimately for improving the quality of American ginseng germplasm.

Key words: expressed sequence tags; functional genes; *Panax quinquefolium*

收稿日期: 2007-12-10.

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划资助项目(2006BAI09B02-1); 国家自然科学基金资助项目(30772735).

* 通讯作者 Tel: 13691481897, Fax: 86-10-62811448, E-mail: jysong@implad.ac.cn

Tel: 13811247366, Fax: 86-10-82995381, E-mail: zhangxw@big.ac.cn

西洋参 (*Panax quinquefolium* L.) 为五加科 (Araliaceae) 人参属名贵药材, 以根入药, 原产于北美洲 (主要是美国和加拿大), 20 世纪八十年代我国引种栽培成功, 主要引种区域包括北京、吉林、陕西、山东等地^[1]。西洋参具有促进记忆、抗癌、降血压、降血脂、抗缺氧和抗疲劳、抗糖尿病、强心、镇静等多种药理作用^[2-5], 与同为五加科的名贵药材人参相比, 其性较温和。现代化学及药理学研究表明西洋参含有生理活性物质皂苷、多糖、黄酮类、挥发油、微量元素等, 其主要有效成分是人参皂苷 (ginsenosides)^[2,6], 人参皂苷含量是衡量西洋参产品质量的重要指标。四年生西洋参根中总皂苷含量已达较高水平。

由于受自身的生理特性限制, 西洋参生长缓慢, 一般需 4~6 年才能收获入药, 随着对西洋参需求的增加, 可供利用的资源已严重不足, 而且西洋参存在连作障碍, 20 年内不能重茬, 适宜栽培地的缺乏制约了西洋参产业的发展。本研究利用植物功能基因组学的技术与方法^[7], 以四年生西洋参根为研究材料, 构建了西洋参根的 cDNA 文库, 对 cDNA 的 5' 端进行测序, 构建表达序列标签 (expressed sequence tags, EST) 文库, 并进一步应用生物信息学方法进行 EST 功能分类研究。试图从功能基因组水平上研究西洋参一系列重要基因的表达及其功能, 这些重要基因包括有效成分生物合成相关的关键酶基因、生长发育相关基因、与胁迫等相关的抗性基因等, 为解决西洋参生长缓慢、连作障碍、人参皂苷积累周期长等问题奠定基础, 对西洋参优良品种的分子设计、产业化发展、满足人们保健治疗需求具有重要意义。

材料与方法

材料和试剂 2007 年 7 月 8 日从中国医学科学院药用植物研究所西洋参栽培基地挖取四年生西洋参根, 流水洗净, 用吸水纸吸干表面水分, 迅速将根切成约 2 mm 厚的薄片, 立即用液氮速冻, 存于 -80 °C 备用。RNase H、T4 DNA Polymerase I、内切酶 *Xho* I 购自 Promega 公司。Trizol 试剂、SuperScript TM II RNase H-Reverse Transcriptase、感受态细胞 DH10B 购自 Invitrogen 公司。*Eco*R I Adaptor、T4 DNA Ligase、T4 PNK、载体 pBluescript II SK(+)XR 购自 Stratagene 公司。Oligotex mRNA Mini Kit 和 QIAEX II Gel Extraction Kit 购自 Qiagen 公司。

cDNA 文库的构建 采用改良的 Trizol 法 (Invitrogen 公司) 从 9.0 g 西洋参根中提取总 RNA^[8],

采用 Oligotex mRNA Mini Kit (Qiagen 公司) 分离纯化 mRNA, 以 mRNA 为模板, 带有 *Xho* I 酶切位点的 Oligo d(T)₁₈ 为引物, 在 SuperScript TM II RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen 公司) 作用下转录出 cDNA 第一链, 以 RNase H 消化 mRNA, 然后以断裂的 mRNA 作为第二链合成的引物, 以 cDNA 第一链为模板, 在 DNA polymerase I 的作用下合成 cDNA 第二链, 在 T4 DNA polymerase I 的作用下将双链 cDNA 的末端补平。补平后的 cDNA 需要经过酚、氯仿、异戊醇纯化, 去除多余的蛋白等杂质。纯化后的 cDNA 双链和 *Eco*R I Adaptor 在 T4 DNA Ligase 的作用下 16 °C 连接过夜。加完接头的 cDNA 双链先在 T4 PNK 的作用下进行末端磷酸化, 然后经内切酶 *Xho* I 酶切消化后, 产生 *Xho* I 粘性末端。采用 QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen 公司) 回收 0.5 kb 到大约 4.0 kb 的目的片段。回收后的目的片段经 DNA 定量 Marker 电泳确定其浓度。以 insert 和 vector 的摩尔数比为 3:1 的比例将 insert (1.0~4.0 kb) 和载体 pBluescript II SK(+)XR 在 T4 DNA Ligase 的作用下 14 °C 连接过夜, 连接体系为 10 μL。所有的连接产物在做转化前经 Millipore 纯化膜纯化去除盐离子。取 1 μL 连接产物电转化感受态细胞 DH10B, 37 °C 过夜培养后观察其生长情况。随机挑取 45 个白色单克隆做菌落 PCR, 引物为 T3 和 T7, 电泳检测 PCR 结果, 计算阳性克隆比率和确定插入片段的长度。

随机挑选 1 248 个克隆对 cDNA 的 5' 端进行测序 挑取 1 248 个白色克隆, 液体培养过夜, 使用碱裂解法提取质粒。提取的质粒 3 μL 加入 2 μL ET Dye 和 1 μL 测序引物 (1 μmol · L⁻¹), 混匀, 放入 PCR 仪进行测序反应, 反应条件是 94 °C 1 min 预变性, 而后是 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。反应完毕后, 用乙醇和乙酸铵对反应产物进行纯化, 纯化好的产物上 3730 测序仪 (ABI 公司) 进行测序。

对 1 069 条 EST 进行分析及功能分类研究 测序得到的原始数据经 Base-calling 生成峰图文件^[9,10]。使用 Phred 软件去除低质量序列^[9,10], Phd2fasta 软件生成序列文件, 再用 Cross_match 软件去除载体和其他污染序列^[9,10], 最后用 Phrap 软件对序列进行拼接并使用 Consed 软件做人工检查和校正^[11,12], 以上软件均使用默认参数。采用序列比对的方法对得到的 unigene 进行注释, 用 BLASTX 程序将 EST 序列与 NCBI 的非冗余蛋白质序列数据库

(nr)进行比较,E值是 $1e-5$ 。BLASTX未能匹配上的序列,使用BLASTN与NCBI的非冗余核酸序列数据库(nt)进行比较,E值是 $1e-10$ 。利用在线InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/webservices/services/interproscan>)搜索得到的GO号(<http://www.geneontology.org/index.shtml>)对unigene(按分子功能,细胞组分,生物学过程)进行分类。

结果

1 cDNA文库的构建及质量检测

四年生西洋参根总RNA显示28S rRNA和18S rRNA两条带,亮度比例约2:1(图1), A_{260}/A_{280} 为1.73,浓度 $1745 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,总计523 μg ,每克西洋参根可得到58.1 μg 总RNA。分离纯化mRNA测A值, A_{260}/A_{280} 为1.79,总计3.6 μg ,每克西洋参根可得到400 ng的mRNA,电泳检测表明总RNA和mRNA质量可用于cDNA文库构建。西洋参根cDNA文库中白/兰斑比率为6:1,文库库容 6.84×10^5 ,随机挑取白色克隆检测,重组率为85%。

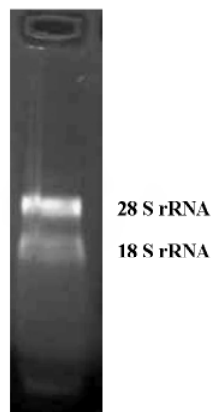
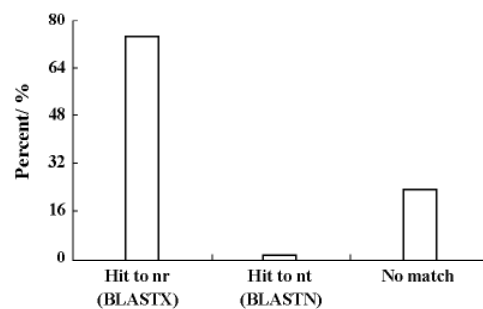


Figure 1 Total RNA extracted from the four-year-old American ginseng roots

2 EST测序、拼接及注释

经过5'端测序、去除低质量序列、载体序列和宿主基因组污染和去除小于100 bp的序列后,共得到1069条高质量的EST序列,计算其平均序列长度为416 bp。经过软件拼接,共得到914条unigene,包含73个序列重叠群(contig)和841条singletons。通过BLASTX和BLASTN搜索比对,总共697个unigene(844个EST)获得了基因注释,其中和公共数据库nr库比对上有680个unigene(825个EST),和nt库比对上的有17个unigene(19个

EST), 占总数76.3%,没有比对上的有217个(23.7%)(图2)。将全部的unigene用Interproscan搜索,709个unigene(779个EST)被预测为蛋白,其中160个unigene(163个EST)在BLAST中没有得到注释,另外有148个unigene(228个EST)在BLAST比对时有注释,但是在Interproscan搜索时找不到任何蛋白的结构域,有57个unigene(62个EST)在Interproscan搜索和BLAST比对时都没有能够被注释,可以认为是新基因。表1从EST数目方面详细描述了文库的分析结果。



Distribution of unique (unassembled+clustered) by BLAST analysis

Figure 2 Approximately 74.5% of the 914 unigenes was hit to nr library, whereas 1.8% of unigenes was hit to nt library and 23.7% of unigenes did not show significant sequence similarity to any genes in GenBank

3 EST(unigene)功能分类研究

通过GO分类,共700个unigene(769个EST)被功能分类。其中278个unigene(309个EST)归入分子功能(molecular function),258个unigene(270个EST)聚类归入细胞组分(cellular component),164个unigene(190个EST)聚类归入生物学过程(biological process),细胞组分包括细胞外区域(extracellular region),细胞器(organelle),大分子复合物(macromolecular complex),细胞(cell),细胞部分(cell part)和细胞器部分(organelle part)6个部分。分子功能(molecular function)包括运输活性(transporter activity),转录调节因子活性(transcription regulator activity),结合活性(binding),催化活性(catalytic activity),酶调节因子活性(enzyme regulator activity),分子传感器活性(molecular transducer activity),结构分子活性(structural molecule activity),翻译调节因子活性(translation regulator activity),抗氧化活性(antioxidant activity)9部分,生物学过程(biological process)包括应激反应(response to stimu-

Table 1 American ginseng 4-year-old root cDNA library and redundancy level of ESTs

Descriptive category	No. of ESTs	%
Total cDNAs sequenced	1 069	100.0
Average length	416 bp	
Clustered(contigs)	73	6.8
Unassembled(singletons)	841	78.7
Redundant	155	14.5
Unique(unassembled + clustered)	914	85.5
Hit to nr(BLASTX)	825	77.2
Hit to nt(BLASTN)	19	1.8
No BLAST	225	21.0
GO	392	
Interproscan	779	
No hit in Interproscan	290	
No BLAST and no Interproscan	62	
BLAST but no Interproscan	228	
Interproscan but no BLAST	163	
EST matches with E-value in BLAST $\geq 1 \times 10^{-14}$	136	
EST matches with E-value in BLAST $< 1 \times 10^{-14}$	708	
Eukaryotic		
Plant/fungal	1 032	
Animal	9	
Others	17	
Prokaryotic(bacterial + archaeal)	10	
Viral	1	

lus), 定位确定过程(establishment of localization), 发育过程(developmental process), 定位(localization), 生物调节(biological regulation), 代谢过程(metabolic process), 细胞过程(cellular process) 7 部分。最大的功能分类是分子功能中的 binding 部分, 占 33%, 其次是分子功能中的催化活性和生物学过程中的代谢过程, 分别占 23.4% 和 21.1%。这一结果显示了四年生西洋参根的基因表达谱的总体情况, 见图 3。

4 EST 文库中的高表达转录本

Unigene 所包含的 EST 数目代表了其表达丰度。在文库中, 表达量最多的基因含有 29 个 EST, 表达丰度最高的前 23 个转录本见表 2。表达最丰富的转录本可能编码衰老相关的蛋白 putative senescence-associated protein (*Pisum sativum*), 表达丰度第二的转录本编码 hypothetical protein (*Vitis vinifera*), 但该转录本与玉米 (*Zea mays*) 的可能 cytochrome P450 monooxygenase (GenBank accession number: T02955) 有 86% 的同源性(identities), Score = 85.5 bits (210), E 值为 $7e-15$, 表明该转录本可能与人参皂苷生物合成相关。

Table 2 Highly expressed transcripts in American ginseng EST library

Rank	Unigene ID	No. of ESTs/%	E value	BLAST homology search
1	gi 13359451	29(2.7)	$6e-26$	Putative senescence-associated protein [<i>Pisum sativum</i>]
2	gi 147835464	19(1.8)	$3e-22$	Hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>]
3	gi 3064039	11(1.0)	$1e-28$	Major latex protein homolog [<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>]
4	gi 51701931	10(0.9)	$4e-88$	RNase-like major storage protein [<i>Panax ginseng</i>]
5	gi 147816254	9(0.8)	$1e-18$	Hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>]
6	gi 13540318	8(0.7)	$6e-58$	S-Adenosyl-L-methionine synthetase [<i>Elaeagnus umbellata</i>]
7	gi 11493822	7(0.7)	$4e-14$	Transcription factor WRKY4 [<i>Petroselinum crispum</i>]
7	gi 1773291	7(0.7)	$3e-31$	Class II small heat shock protein Le-HSP17.6 [<i>Lycopersicon esculentum</i>]
7	gi 18399690	7(0.7)	$9e-6$	Zinc finger (AN1-like) family protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
8	gi 112717	6(0.6)	$1e-29$	21 kDa Protein precursor (1.2 protein) [<i>Daucus carota</i>]
8	gi 147799894	6(0.6)	$1e-61$	Hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>]
8	gi 2688824	6(0.6)	$4e-20$	Putative auxin-repressed protein [<i>Prunus armeniaca</i>]
8	gi 147803053	6(0.6)	$1e-63$	Hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>]
9	gi 15230306	5(0.5)	$3e-12$	Unknown protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
10	gi 61211866	5(0.5)	$4e-47$	Specific abundant protein 1 [<i>Panax ginseng</i>]
10	gi 115475611	5(0.5)	$2e-9$	Os08g0266200 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]
10	gi 146215994	5(0.5)	$4e-63$	Cysteine protease Cp1 [<i>Actinidia deliciosa</i>]
10	gi 2407330	5(0.5)	$1e-25$	Metallothionein-1 like protein Mrna [<i>Oenanthe javanica</i>]
10	gi 147783534	5(0.5)	$6e-9$	Hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>]
10	gi 92898176	5(0.5)	$4e-17$	Hypothetical protein MtrDRAFT_AC125389_g23v2 [<i>Medicago truncatula</i>]
10	gi 147865345	5(0.5)	$2e-27$	Hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>]
10	gi 22074816	5(0.5)	$3e-12$	Phloem protein 2-2 [<i>Apium graveolens</i> var. dulce]
10	gi 7406673	5(0.5)	$4e-12$	Putative metallothionein-like protein [<i>Vitis vinifera</i>]

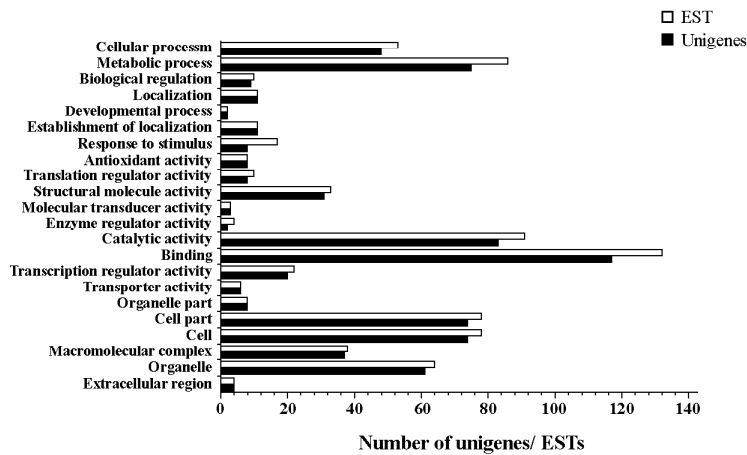


Figure 3 The EST and unigene were functionally categorized into 22 putative categories

将作者建立的文库数据与已经发表的四年生人参根 cDNA 文库^[13]比较,人参根文库中高表达的前 10 位基因,在本文库中能找到 6 个(表 3)。

5 与人参皂苷生物合成相关的基因

人参皂苷的生物合成途径见图 4^[13~15],从西洋参根 EST 文库鉴定得到 10 个可能编码人参皂苷生物合成途径关键酶的基因,分别编码 cytochrome P450, glucosyltransferase, farnesyltransferase, cyclase family protein, 以及 1 个与人参 GBR mRNA 高度同源的基因(96%),共涉及 11 条 EST 序列,见表 4。

Table 3 Compared to highly expressed transcripts in ginseng EST library (Pg03) with American ginseng EST library

Rank	Description	Pg03 (root)		American ginseng root	
		Percent	NO. of ESTs	Percent	NO. of ESTs
1	Ribonuclease 2	2.4%	1	0.1%	1
2	Dehydrin 2	1.9%	1	0.1%	1
3	Eukaryotic initiation factor	1.6%	4	0.4%	4
4	WSI protein (KS-type dehydrin)	1.1%	0	0	0
5	Unknown	1.1%	35	3.3%	35
6	Late embryogenesis protein lea5	0.6%	1	0.1%	1
7	Early nodulin 8 precursor	0.6%	0	0	0
8	Ribonuclease 1	0.5%	2	0.2%	2
9	Metallothionein-like protein class II	0.5%	3	0.3%	3
10	WSI724 (KS-type dehydrin)	0.5%	0	0	0

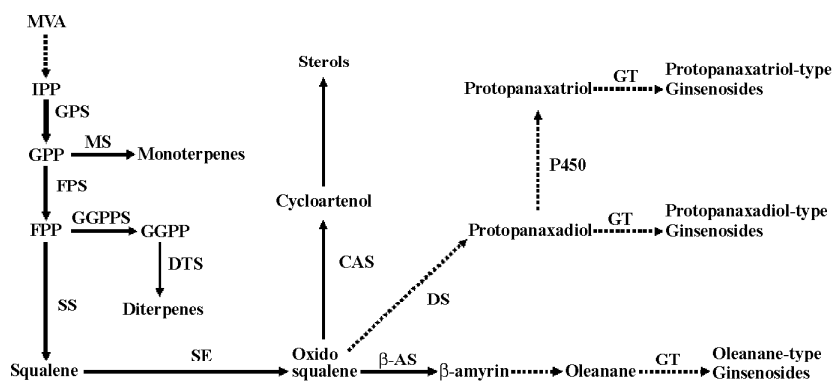


Figure 4 Putative biosynthetic pathway of ginsenoside and triterpenoids. MVA: Mevalonate; IPP: Isopentenyl diphosphate; GPP: Geranyl diphosphate; FPP: Farnesyl diphosphate; GGPP: Geranyl geranyl diphosphate; GPS: Geranyl diphosphate synthase; FPS: Farnesyl diphosphate synthase; GGPPS: Geranyl geranyl diphosphate synthase; MS: Monoterpenes synthase; DTS: Diterpenes synthase; SS: Squalene synthase; SE: Squalene epoxidase; CAS: Cycloartenol synthase; β -AS: β -Amyrin synthase; DS: Dammareniol synthase; GT: Glucosyltransferase; dotted lines: indicate uncharacterized regions of the pathway^[13~15]

Table 4 Candidate genes encoding enzymes associated with ginsenoside biosynthetic pathway

UniGene ID	BLAST homology search	Accession Number	Score	E value
gi 29123069	<i>Panax ginseng</i> GBR mRNA, complete cds	AF485335	311 bits (344)	2e-81
gi 27529726	Cytochrome P450 [<i>Petunia x hybrida</i>]	BAC53892	131 bits (330)	1e-29
gi 144923929	Cytochrome P450 monooxygenase CYP704G7 [<i>Medicago truncatula</i>]	ABC59095	189 bits (479)	2e-57
gi 85001705	Cytochrome P450 monooxygenase CYP71D54 [<i>Glycine max</i>]	ABC68406	136 bits (342)	5e-31
gi 584864	Cytochrome P450 76A1 (CYPLXXVIA1) (P-450EG8)	P37121	64.7 bits (156)	1e-11
gi 780785	Sucrose-UDP glucosyltransferase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	BAD94975	133 bits (334)	4e-30
gi 15235900	Putative glucosyltransferase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	AAD15482	62.4 bits (150)	9e-09
gi 28380078	Hydroquinone glucosyltransferase (Arbutin synthase)	Q9AR73	252 bits (644)	6e-66
gi 15239937	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	NP_196793	158 bits (399)	1e-37
gi 18418598	Cyclase family protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	NP_567979	102 bits (254)	1e-20
gi 147825148	<i>Catharanthus roseus</i> farnesyltransferase /type I	AF525030	102 bits (112)	1e-18

讨论

从一定时期植物特定组织得到的 cDNA 文库代表着该组织正在表达的有功能的基因。为研究西洋参有效成分生物合成途径关键酶的基因,需要选取相关基因高效表达时期的材料,即有效成分含量高的西洋参组织作为实验材料。鉴于西洋参的根为其主要药用部位,且四年生西洋参根中总皂苷含量已达较高水平,本文首次报道西洋参四年生根 EST 文库构建和功能分析,结果表明,EST 文库构建是批量发现功能基因的有效手段。914 个 unigene 中 433 个 unigene 与 GenBank 库中已知生物化学功能的序列具有同源性,占所克隆基因的 47.4%,264 个 unigene 与 GenBank 库中未知功能的序列具有同源性,占所克隆基因的 28.9%,217 个 unigene 在 GenBank 库中没有同源性序列,占所克隆基因的 23.7%。在 914 个 unigene 中,获得 11 个与人参皂苷生物合成途径相关的基因,分别编码 cytochrome P450, glucosyltransferase, farnesyltransferase, cyclase family protein^[13,16] 以及与人参 GBR mRNA 高度同源的基因(96%)^[17],这些基因的发现为进一步克隆基因全长、研究基因功能及其开发利用、改良西洋参品质提供了依据。最近,本课题组已经获得两个糖基转移酶和两个 P450 的基因全长,正在开展其功能鉴定的研究。

此外,获得 6 个与生长素调节生长发育相关的基因,分别编码 1 个 putative auxin-repressed/dormancy-associated protein^[18]、3 个 putative auxin-repressed protein^[19,20]、1 个 auxin response factor 4^[21] 和 1 个 auxin-regulated protein^[22,23],这表明生长素在西洋参根的生长发育过程中起重要调控作用,为研究西洋参生长缓慢的分子机制奠定了基础。

本研究还获得与水分胁迫相关的基因 7 个:3 个编码蛋白 dehydrin、3 个编码蛋白 lea、1 个编码 DC2.15 like 蛋白,与受伤诱导相关的基因 2 个:分别编码蛋白 AP2 like factor 2 和 Wound-induced basic protein,与编码抗氧化酶相关的基因 6 个:1 个编码 glutathione peroxidase、2 个编码 ascorbate peroxidase、2 个编码 cationic peroxidase、1 个编码 catalase,这些基因与西洋参对环境胁迫的响应有密切关系,是西洋参适应环境的分子应答。

在西洋参抗病基因的挖掘方面发现:1 个基因编码 pathogenesis-related transcriptional factor and ERF、4 个基因编码 transcription factor WRKY 家族蛋白、7 个基因编码 ribonuclease 蛋白家族,这些基因编码的蛋白与植物防御病原入侵相关^[24,25]。这些发现对研究西洋参的抗病机制和提高西洋参的抗病性具有重要指导作用。

致谢:中国医学科学院药用植物研究所高微微研究员提供西洋参实验材料。

References

- [1] Liu TC. Introduction and cultivation of American ginseng in China [J]. J Chin Med Mater (中药材), 1990,13: 42-45.
- [2] Attele AS, Wu JA, Yuan CS. Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions [J]. Biochem Pharm, 1999,58:1685-1693.
- [3] Kitts DD, Hu C. Efficacy and safety of ginseng [J]. Public Health Nutr, 2000,3:473-485.
- [4] Ma SC, Jiang YT, Song SJ, et al. Alkaline-degradation products of ginsenosides from leaves and stems of *Panax quinquefolium* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2005, 40:924-930.
- [5] Zhang JT. Nootropic mechanisms of ginsenoside Rg1

- influence on neuronal plasticity and neurogenesis [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2005,40:385-388.
- [6] Dou D, Li W, Guo N, et al. Ginsenoside Rg8, a new dammarane-type triterpenoid saponin from roots of *Panax quinquefolium* [J]. Chem Pharm Bull, 2006,54:751-753.
- [7] Wang W, Zhu P, Cheng KD. The current status of the plant genome and EST research in medicinal plants [J]. J China Biotechnol (中国生物工程杂志), 2004,24:1-5.
- [8] Wang K, Wang Y, Bao YL, et al. A method for high-quality RNA extraction from *Panax ginseng* plant tissues [J]. Prog Biochem Biophys (生物化学与生物物理进展), 2006,33:95-99.
- [9] Ewing B, Hillier L, Wendt MC, et al. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment [J]. Genome Res, 1998,8:175-185.
- [10] Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities [J]. Genome Res, 1998,8:186-194.
- [11] Gordon D, Desmarais C, Green P. Automated finishing with autofinish [J]. Genome Res, 2001,11:614-625.
- [12] Gordon D. Viewing and editing assembled sequences using Consed [M]//Baxevanis AD, Davison DB. Current protocols in bioinformatics, New York: John Wiley & Co, 2004:11.2.1-11.2.43.
- [13] Jung JD, Park HW, Hahn Y, et al. Discovery of genes for ginsenoside biosynthesis by analysis of ginseng expressed sequence tags [J]. Plant Cell Rep, 2003,22:224-230.
- [14] Chappell J. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1995,46:521-547.
- [15] Schmidt A, Gershenzon J. Cloning and characterization of isoprenyl diphosphate synthases with farnesyl diphosphate and geranylgeranyl diphosphate synthase activity from Norway spruce (*Picea abies*) and their relation to induced oleoresin formation [J]. Phytochemistry, 2007, doi:10.1016/j.phytochem.2007.05.037
- [16] Kim MK, Lee BS, In JG, et al. Comparative analysis of expressed sequence tags (ESTs) of ginseng leaf [J]. Plant Cell Rep, 2006,25:599-606.
- [17] Liu SP, Luo ZY, Chen XH, et al. Molecular cloning and sequence analysis of GBR6, a novel candidate gene involved in ginsenoside biosynthesis from *Panax ginseng* [J]. Life Sci Res (生命科学研究), 2004,8:351-354.
- [18] Stafstrom JP, Ripley BD, Devitt ML, et al. Dormancy-associated gene expression in pea axillary buds. Cloning and expression of PsDRM1 and PsDRM2 [J]. Planta, 1998,205:547-552.
- [19] Kim HB, Lee H, Oh CJ, et al. Expression of EuNOD-ARP1 encoding auxin-repressed protein homolog is upregulated by auxin and localized to the fixation zone in root nodules of *Elaeagnus umbellata* [J]. Mol Cells, 2007,23:115-121.
- [20] Shimizu M, Suzuki K, Miyazawa Y, et al. Differential accumulation of the mRNA of the auxin-repressed gene CsGRP1 and the auxin-induced peg formation during gravimorphogenesis of cucumber seedlings [J]. Planta, 2006,225:13-22.
- [21] Pekker I, Alvarez JP, Eshed Y. Auxin response factors mediate *Arabidopsis* organ asymmetry via modulation of KANADI activity [J]. Plant Cell, 2005,17:2899-2910.
- [22] Scherer GF, Zahn M, Callis J, et al. A role for phospholipase A in auxin-regulated gene expression [J]. FEBS Lett, 2007,581:4205-4211.
- [23] Tatematsu K, Kumagai S, Muto H, et al. MASSUGU2 encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell, 2004,16:379-393.
- [24] Robatzek S, Somssich IE. Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense [J]. Genes Dev, 2002,16:1139-1149.
- [25] Zhang Z, Yao W, Dong N, et al. A novel ERF transcription activator in wheat and its induction kinetics after pathogen and hormone treatments [J]. J Exp Bot, 2007, [Epub ahead of print].